
Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

Einfluss von Pantoprazol auf die Frakturheilung im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

Vorgelegt von: David Stenger

geboren am: 31.08.1983 in Neunkirchen/Saar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung / Abstract	4
2 Einleitung	11
2.1 Knochen	11
2.1.1 Morphologie	11
2.1.2 Histologie	11
2.1.3 Funktion	13
2.2 Frakturheilung	13
2.2.1 Primäre Frakturheilung	14
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung	14
2.3 Wachstumsfaktoren	16
2.3.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)	16
2.3.2 Cystein-rich Protein 61 (CYR 61)	17
2.3.3 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)	17
2.3.4 Osteoprotegerin (OPG)	17
2.4 Frakturmodelle	18
2.4.1 Großtiermodelle	18
2.4.1.1 Schaf	18
2.4.1.2 Hund	19
2.4.2 Kleintiermodelle	19
2.4.2.1 Kaninchen	19

2.4.2.2	Ratte	19
2.4.2.3	Maus	20
2.5	Pantoprazol	23
2.5.1	Struktur	24
2.5.2	Wirkmechanismus	24
2.5.3	Pharmakokinetik	25
2.5.4	Indikation und Anwendung	26
2.5.5	Nebenwirkungen	27
2.6	Zielsetzung	28
2.7	Fragestellung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Methoden	29
3.1.1	Studiendesign	29
3.1.2	Tiermodell	30
3.1.3	Operationsverfahren	31
3.1.4	Medikamentenapplikation	35
3.1.5	Tötung der Tiere	35
3.1.6	Präparation der Knochen	35
3.2	Zielkriterien und Auswertung	36
3.2.1	Radiologie	36
3.2.2	Biomechanik	37
3.2.3	Histologie	38
3.2.3.1	Trichrome Masson-Goldner-Färbung	40
3.2.3.2	TRAP-Färbung	41
3.2.4	Western Blot	42
3.3	Statistik	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Radiologie	45
4.2	Biomechanik	46

4.3	Histologie	48
4.4	Western Blot	52
5	Diskussion	56
5.1	Diskussion der Methoden	56
5.2	Diskussion der Ergebnisse	61
6	Literaturverzeichnis	68
7	Danksagung	88
8	Publikationen	90
8.1	Vorträge und Poster	90
8.2	Publikationen	90
	Abbildungsverzeichnis	91
	Tabellenverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom P
CYR 61	Cystein-rich Protein 61
DDD	definierte Tagesdosen (engl. Defined Daily Dose)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit
G	Gauge
g	Gramm
H. pylori	Helicobacter pylori
H	Wasserstoff
h	Stunde

HPF	High-Power Field
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
K	Kalium
kV	Kilovolt
l	Liter
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm^2	Quadratmillimeter
mol	Mol
MW	Mittelwert
N	Newton
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OPG	Osteoprotegerin
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
s	Sekunden
Tab.	Tabelle

TRAP tartrate resistant acid phosphatase

vs. versus

1 Zusammenfassung / Abstract

Einfluss von Pantoprazol auf die Frakturheilung im Mausmodell

Protonenpumpeninhibitoren, wie Pantoprazol, zählen zu den am meist verordneten Medikamenten weltweit. Sie werden vor allem zur Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit und zur Prophylaxe von nichtsteroidalen Antirheumatika induzierten Ulcera eingesetzt. In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren das Frakturrisiko erhöht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Protonenpumpeninhibitoren durch Hemmung der H^+ -ATPase der Osteoklasten, die Knochenresorption vermindern. Bisher gibt es keine Studien dazu, inwieweit die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren den Frakturheilungsprozess beeinflusst. Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss von Pantoprazol auf die Frakturheilung im Mausmodell zu untersuchen.

Die Frakturheilung wurde in einem standardisierten, geschlossenen Femurfrakturmodell der Maus untersucht. Als Versuchstiere wurden 12 bis 14 Wochen alte CD-1 Mäuse (n=48) verwendet. Nach Frakturierung des jeweils rechten Femurs und Stabilisierung mittels intramedullärer Zugschraube wurde den Versuchstieren täglich 100 mg/kg Körpergewicht Pantoprazol (n=24) intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolltiere (n=24) erhielten eine äquivalente Menge isotoner Kochsalzlösung. Zwei beziehungsweise fünf Wochen nach operativer Versorgung und Behandlung mit Pantoprazol oder einer

äquivalenten Dosis isotoner Kochsalzlösung wurden die Tiere nach vorheriger Narkotisierung durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden sowohl das verheilte Femur als auch das kontralaterale, gesunde Femur für weitere radiologische, biomechanische, histologische sowie proteinbiochemische Analysen freipräpariert und entnommen.

Zur Beurteilung der knöchernen Überbauung des Frakturspaltes wurden Röntgenbilder angefertigt. Die radiologische Auswertung erfolgte dann mittels Goldberg-Score. Eine ausbleibende knöcherne Überbauung wurde mit 0 Punkten bewertet, eine partielle knöcherne Überbauung mit 1 Punkt. 2 Punkte wurde für eine vollständige knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes vergeben.

Die Stabilität des Frakturkallus wurde nach Entfernung der Implantate biomechanisch mittels 3-Punkt-Biege-Testung untersucht. Dazu wurde zerstörungsfrei die Biegesteifigkeit anhand eines Kraft-Weg-Diagramms des verheilten Knochens sowie die des kontralateralen, gesunden Knochens als interne Kontrolle ermittelt. Aus diesem Grund wurden zusätzlich alle Werte des verheilten Knochens in Relation zum kontralateralen, gesunden Knochen angegeben. Die Biegesteifigkeit wurde im Bereich des linearen Anteils des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt.

Zur histologischen Auswertung wurden 5 µm dicke sagittale, longitudinale Schnittpräparate nach der trichromen Masson-Goldner-Methode gefärbt. Es wurde der Kallusdurchmesser sowie die Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes bestimmt. Des Weiteren wurde der relative Anteil an Knochen, Knorpel und Bindegewebe in Bezug zur Gesamtfläche des periostalen Kallus ermittelt. Zur quantitativen Analyse der Osteoklastenzahl wurde zusätzlich eine tartrate-resistant acid phosphatase Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die tartrate-resistant acid phosphatase positiven Zellen im Kallus bestimmt.

Zur proteinbiochemischen Untersuchung des Kallusgewebes wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Zur Beurteilung der Knochenbildung und Aktivität der Osteoblasten wurden verschiedene osteogene Marker wie bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-4 sowie cystein-rich protein 61 bestimmt. Zur Beurteilung

der Knochenresorption wurde die Expression von Receptor Activator of NF- κ B Ligand und Osteoprotegerin bestimmt. Zusätzlich wurde anhand der proliferating cell nuclear antigen-Expression die Zellproliferation beurteilt.

Nach Analyse der radiologischen, biomechanischen, histomorphometrischen und proteinbiochemischen Untersuchungen zeigten sich folgende Ergebnisse:

1. Sowohl 2 Wochen als auch 5 Wochen postoperativ konnte bei den mit Pantoprazol behandelten Tieren ein geringerer Goldberg-Score ermittelt werden. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.
2. Bereits 2 Wochen postoperativ war die Biegesteifigkeit nach Gabe von Pantoprazol geringer. 5 Wochen postoperativ zeigte sich eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies spricht für eine verminderte Kallusqualität nach Behandlung mit Pantoprazol.

Die Behandlung mit Pantoprazol hatte jedoch keinen Einfluss auf den gesunden Knochen. Sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen unterschied sich die Biegesteifigkeit des gesunden Knochens in beiden Gruppen nicht signifikant.

3. Das Verhältnis der periostalen Kallusfläche und des Kallusdurchmessers in Relation zum Femurdurchmesser war in beiden Gruppen sowohl 2 Wochen postoperativ als auch 5 Wochen postoperativ vergleichbar. Zudem unterschied sich der Anteil an Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe im Frakturkallus nach zweiwöchiger Frakturheilung in beiden Gruppen nicht signifikant. 5 Wochen postoperativ war jedoch bei den Tieren, die mit Pantoprazol behandelt wurden, der Knochenanteil signifikant geringer und der Knorpel- und Bindegewebsanteil entsprechend signifikant erhöht. Die Anzahl der tartrate-resistant acid phosphatase positiven Zellen im Frakturkallus 2 Wochen postoperativ war in beiden Gruppen vergleichbar, jedoch waren in der Kontrollgruppe die Mehrzahl im knöchernen Kallusanteil nachweisbar, während in der Pantoprazolgruppe diese vor allem im knorpeligen Anteil zu finden waren. 5 Wochen postoperativ waren in der Pantoprazol-Gruppe nur noch wenige Osteoklasten im Knochengewebe nachweisbar. In der Kontrollgruppe fanden sich keine mehr.

4. Die Behandlung mit Pantoprazol führte zu einer signifikant verminderten Expression der osteogenen Marker bone morphogenetic protein-2 und bone morphogenetic protein-4 sowie einer deutlich verminderten Expression des osteogenen Markers cystein-rich protein 61. Des Weiteren zeigte sich eine signifikant verminderte Expression des Proliferationsmarkers proliferating cell nuclear antigen. Receptor Activator of NF- κ B Ligand, ein Marker der Osteoklastenaktivität, war ebenfalls signifikant erniedrigt. Die Expression von Osteoprotegerin war entsprechend erhöht. Damit war das Verhältnis von Osteoprotegerin/Receptor Activator of NF- κ B Ligand zu Gunsten des Osteoklasteninhibitors Osteoprotegerin verschoben.

Zusammenfassend konnte in der hier vorgestellten Studie gezeigt werden, dass die Behandlung mit Pantoprazol durch Hemmung der Knochenbildung und der Knochenresorption den Remodelingprozess verzögert und damit die Frakturheilung beeinträchtigt.

Influence of Pantoprazole of fracture healing in mice

Acid-suppression medications such as proton pump inhibitors are among the most widely prescribed medications worldwide. Proton pump inhibitors are commonly used drugs for the therapy of reflux esophagitis, peptic ulcers and other acid-related gastrointestinal disorders. In addition, proton pump inhibitors are used in combination with an analgetic therapy, first of all with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Recent studies have now reported potential adverse consequences of chronic acid suppression, including an increased risk for bone fractures. In vitro and human data suggest that proton pump inhibitors decrease bone resorption by inhibiting osteoclastic vacuolar H⁺-ATPase. There is a complete lack of information on whether proton pump inhibitors influence the process of bone healing and regeneration. Therefore, we herein studied the effects of pantoprazole on fracture healing in a standardized femur fracture model in mice.

Bone healing was studied in a murine closed femur fracture model. For the present study 12- to 14-weeks old animals (n=48) were used. After fracture and stabilization of the

right femora with an intramedullary screw, 24 mice were treated daily intraperitoneal with 100 mg/kg body weight pantoprazole. Another 24 vehicle (saline)-treated mice served as controls. At the end of the 2 and 5 weeks observation period the animals were reanesthetized and sacrificed by cervical dislocation. For further analysis, the healed femur and the contralateral femur were resected and freed from soft tissue.

For radiological analysis, ventro-dorsal radiographs of the healed femora were performed. Fracture healing was analyzed according to the classification of Goldberg with stage 0 indicating radiological non-union, stage 1 indicating possible union and stage 2 indicating radiological union.

For biomechanical analysis, the right and the left femora were resected at 2 and 5 weeks. After removing the implants, callus stiffness was measured with a non-destructive test using a 3-point bending device. To account for differences in bone stiffness of the individual animals, the unfractured left femora were also analyzed, serving as an internal control. All values of the fractured femora are given in percent of the corresponding unfractured femora and as absolute values. The bending stiffness was calculated from the linear elastic part of the load-displacement diagram.

For histological analysis, sagittal, longitudinal sections of 5 μ m thickness were stained according to the trichrome method. The callus diameter and the total callus area in relation to the femoral bone diameter at the fracture gap were analyzed. Furthermore, the amount of bone tissue and fibrous tissue were measured in relation to the total callus area. In addition, tartrate-resistant acid phosphatase activity was analyzed in the callus at 2 weeks after fracture healing. The number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells (three or more nuclei each cell) were counted.

To analyze protein expression, Western blot analysis of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4, cysteine-rich protein 61, proliferating cell nuclear antigen, receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin were performed.

The radiological, biomechanical, histomorphometric and Western blot analyses revealed the following results:

1. Radiological analyses at 2 and 5 weeks after fracture demonstrated a lower Goldberg score after pantoprazole treatment compared to controls, however, the differences did not prove to be statistically significant.
2. Biomechanical analysis showed in pantoprazole-treated animals compared to controls a reduced bending stiffness at 2 weeks after fracture and a significantly lower bending stiffness at 5 weeks after fracture. This indicates a decreased quality of the newly formed bone after pantoprazole treatment. Of interest, comparison of bending stiffness of the non-fractured control femora did not show significant differences between pantoprazole-treated animals and controls at 2 weeks after fracture and at 5 weeks after fracture. Therefore, we can conclude that the 5-weeks pantoprazole treatment did not affect bone quality of non-fractured femora.
3. The analysis of the total callus area in relation to the femur diameter did not show significant differences between the both groups after 2 and 5 weeks of fracture healing. After 2 weeks the callus of the both groups showed comparable amounts of bone, cartilaginous and fibrous tissue. After 5 weeks, however, the amount of bone tissue was significantly lower and the amount of remnant cartilaginous and fibrous tissue was significantly higher after pantoprazole treatment. Analysis of the number of tartrate-resistant acid phosphatase positive osteoclasts in the callus at 2 weeks after fracture healing could not show a significant difference between the both groups. In saline-treated controls almost all positively stained cells were found in the osseous tissue. Only few tartrate-resistant acid phosphatase positive osteoclasts were found within the cartilaginous tissue. In pantoprazole-treated animals the amount of positively stained cells within the cartilaginous tissue was higher when compared to controls. However, the difference did not prove to be statistically significant. After 5 weeks only few tartrate-resistant acid phosphatase positive osteoclasts could be found in the osseous tissue of the callus of pantoprazole-treated animals, and no positively stained cells were found in the callus of saline-treated controls.

4. After 2 weeks of fracture healing Western blot analysis of the callus tissue revealed that pantoprazole reduced the expression of bone formation markers bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-4 and cystein-rich protein 61. In addition, the expression of proliferating cell nuclear antigen, indicating cell proliferation, was also significantly reduced after pantoprazole treatment. Of interest, the expression of osteoprotegerin, an inhibitor of osteoclastogenesis, was found slightly increased in the callus of pantoprazole-treated animals compared to controls, while the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, a stimulator of osteoclastogenesis, was found significantly reduced after pantoprazole treatment. This indicates a significant increase of the osteoprotegerin/receptor activator of NF- κ B ligand ratio after pantoprazole treatment.

In conclusion, pantoprazole treatment delays fracture repair most probably by affecting both bone formation and bone remodeling through down-regulation of bone formation markers and inhibition of osteoclast activity.

2 Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Morphologie

Anhand ihrer Form unterscheidet man lange Knochen (Röhrenknochen), kurze Knochen (Handwurzelknochen, Fußwurzelknochen), platte Knochen (Schädeldach, Brustbein, Schulterblatt, Hüftbein) und unregelmäßige Knochen (Knochen der Schädelbasis, Wirbel und Rippen) [98]. Das Femur, das für diese Studie verwendet wurde, wird zu den langen Knochen gezählt. Diese kann man in verschiedene Bereiche unterteilen. Am proximalen und distalen Ende befindet sich die Epiphyse, die von hyalinem Knorpel überzogen ist und Teil eines Gelenkes darstellt. Jeweils zur Mitte hin schließt sich die Metaphyse an. Den mittleren, schaftförmigen Abschnitt nennt man Diaphyse [98]. Die Diaphyse des Femurs wurde für diese Studie frakturiert.

Makroskopisch besteht der Knochen aus einer äußeren Substantia compacta und einer inneren Substantia spongiosa [98].

2.1.2 Histologie

Histologisch besteht der Knochen aus Knochenzellen, sogenannten Osteozyten, und der Interzellulärsubstanz. Die Interzellulärsubstanz setzt sich aus organischen Bestandteilen (Kollagenfasern, Glykosaminoglykane, Osteonektin, Osteokalzin) und anorganischen

Bestandteilen (unter anderem Hydroxylapatit) zusammen. Aufgrund der Anordnung der Knochenzellen und Interzellulärsubstanz unterscheidet man Lamellenknochen und Geflechtknochen. Im Lamellenknochen sind die Kollagenfasern regelmäßig von Lamelle zu Lamelle in einem unterschiedlichen Steigungswinkel angeordnet. Im Gegensatz dazu sind im Geflechtknochen die Kollagenfasern der Knochenmatrix in groben Bündeln ungeordnet ausgerichtet. Geflechtknochen entsteht bei desmaler und enchondraler Ossifikation sowie nach Knochenbrüchen in der frühen Phase der Knochenheilung. Geflechtknochen enthält relativ viele knochenbildende Osteoblasten, ist gut durchblutet und weniger mineralisiert als Lamellenknochen. Im Rahmen der Frakturheilung wird der Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut [143].

Um einen zentralen, längsverlaufenden Kanal, auch Zentralkanal oder Havers-Kanal genannt, ordnen sich beim menschlichen Knochen 4 bis 20 Komplexe aus Osteonlamellen konzentrisch an und bilden somit die Osteone, die auch als Havers-System bezeichnet werden. Diese haben einen Durchmesser von etwa 300 μm und eine Länge von durchschnittlich 0,5 bis 1 cm. In dem Zentralkanal verlaufen Blutgefäße, vegetative Nerven, lockeres Bindegewebe und Zellen des Endosts. Der Durchmesser dieser Kanäle variiert zwischen 20 bis 100 μm . Die Blutgefäße der einzelnen Havers-Kanäle stehen über Volkmann-Kanäle miteinander in Verbindung. Schaltlamellen, die Reste von Osteonen darstellen, füllen den Raum zwischen den einzelnen Osteonen auf [143].

Verglichen mit dem menschlichen Knochen ist der Knochen der Maus relativ primitiv aufgebaut. Anstelle von Havers-Kanälen besitzt die Maus Resorptionskanäle, von denen die Knochenheilung mit Hilfe von Osteoblasten ausgeht [118].

Nach außen hin wird die Substantia compacta vom Periost bedeckt. Ausnahme sind die mit Gelenkknorpel überzogenen Bereiche. Das Periost ist wiederum aus zwei Schichten aufgebaut. Zum einen beinhaltet es das Stratum osteogenicum, die knochenbildende Schicht, die auch Kambiumschicht genannt wird. In dieser Schicht sind beim jugendlichen Knochen viele Osteoblasten zu finden, beim erwachsenen Knochen sind diese nur noch vereinzelt vorhanden. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass die Vorläuferzellen bei Bedarf, zum Beispiel im Rahmen der Frakturheilung, zu Osteoblasten umgewandelt

werden. Das Stratum fibrosum, das dem Stratum osteogenicum aufliegt, wird auch Faserschicht genannt, da es aus einem Geflecht zugfester Fasern, sogenannten Sharpey-Fasern, besteht. Es dient der Befestigung von Muskeln, Sehnen und Bändern [98].

2.1.3 Funktion

Der Knochen hat verschiedene Aufgaben. Zum einen verrichtet er eine Stütz- und Strukturfunktion. Er dient aber auch als Kalziumspeicher und nimmt an verschiedenen Stoffwechselprozessen teil.

Als Modeling wird die Fähigkeit des Knochens beschrieben, sich an bestimmte mechanische Belastungen durch spezifische Formveränderungen anzupassen. Dieser Vorgang läuft vor allem während der Wachstumsphase ab. Als Remodeling wird die Kombination zwischen Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenaufbau durch Osteoblasten bezeichnet. Der Prozess des Remodelings findet fortlaufend statt und zeigt, dass der Knochen sich permanent an die wechselnden Bedingungen anpasst [124]. Dieses Zusammenspiel wird von verschiedenen Zellen aus dem Endost, Periost und dem Havers-System beeinflusst [122].

2.2 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist nach Zucman [181] ein physiologischer Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird und mit der Neubildung von Knochengewebe endet. Für eine erfolgreiche Frakturheilung müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden: eine ausreichende Ruhigstellung, ein ausreichender Knochenkontakt der Fragmente sowie eine adäquate Vaskularisierung [133].

Die Frakturheilung hängt des Weiteren von verschiedenen Einflussfaktoren wie Alter, Lokalisation und Schweregrad der Fraktur sowie Knochenstruktur ab. Zudem können

auch medikamentöse Wechselwirkungen sowie das Operationsverfahren die Frakturheilung beeinflussen. Man unterscheidet zwei Arten der Knochenheilung: die primäre und die sekundäre Knochenheilung [133].

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Bei der primären Frakturheilung, die erstmals 1909 durch Lane [93] beschrieben wurde, wachsen beide Fragmente ohne eine äußere Kallusbildung wieder zusammen. Dies kann nur vonstattengehen, wenn eine mechanische Frakturstabilität und eine ausreichende Vaskularisierung vorhanden sind. Aufgrund der genannten Voraussetzungen kommt es eigentlich nur bei einer optimalen anatomischen Fraktureposition und einer anschließenden operativen Versorgung mittels stabiler Osteosynthese zu einer primären Frakturheilung. Man unterscheidet abhängig von der absoluten Größe des Frakturspalts die Spaltheilung (Frakturspalt größer als 0,2 mm) und die Kontaktheilung (Frakturspalt kleiner als 0,2 mm).

Laut Rüter et al. [136] wird bei der Spaltheilung innerhalb der ersten 3 bis 4 Wochen nach Frakturentstehung der Frakturspalt mit Geflechtknochen aufgefüllt und im Anschluss zu Lamellenknochen umgebaut.

Rüter et al. [136] sagen zudem, dass im Rahmen der Kontaktheilung die Knochenregeneration durch longitudinal einwachsende Osteone abläuft. Osteoklasten höhlen in der Kortikalis des gegenüberliegenden Fragments einen Resorptionskanal aus, der durch den gebildeten Lamellenknochen wieder aufgefüllt wird. So werden die Knochenfragmente direkt miteinander verbunden. Bis die primäre Knochenheilung komplett abgeschlossen ist, vergehen 1,5 bis 2 Jahre [122].

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Die meisten Frakturen heilen nach dem Prinzip der sekundären Frakturheilung, da meist keine komplette anatomische Reposition erreicht werden kann. Die Frakturheilung

läuft dabei in verschiedenen, sich überlappenden Phasen ab [44]:

- Frakturphase mit Hämatombildung
- Entzündungsphase
- Angiogenese und Chondrogenese
- Chondrale und desmale Ossifikation
- Phase des Umbaus (Modeling und Remodeling)

Nach Rüter et al. [136] wird in der Frakturphase nach Verletzung der Knochenkontinuität meist das umliegende Weichteilgewebe mitgeschädigt, so dass ein Hämatom im Frakturbereich entsteht.

Im Rahmen der Entzündungsphase erfolgt eine überschießende Kapillaraussprossung sowie eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen als Vorläufer der Osteoblasten, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen [130, 136]. Die Aufgaben der Mastzellen in diesem Zusammenhang sind noch nicht endgültig geklärt. Man glaubt jedoch, dass sie Heparin und heparinähnliche Substanzen ausschütten und so die lokale Vaskularisierung und Zellmigration beeinflussen. Außerdem beschreiben einige Studien, dass die Mastzellen, die aus dem hämatopoetischen System hervorgehen, als Vorläuferzellen der Osteoklasten betrachtet werden können [19, 130, 136, 162].

Auf die bis zu 4 Wochen andauernde Entzündungsphase folgt die Granulationsphase, die von lokal wirksamen Wachstumsfaktoren gesteuert wird. Ebenso sind an der Heilung der Kalzium-, Parathormon- und Vitamin-D-Stoffwechsel beteiligt. Das Hämatom wird durch Granulationsgewebe aus Lymphozyten, zahlreichen Kapillaren und Fibroblasten, die zusammen mit Osteoblasten Kollagen Typ I bilden, ersetzt. Neben den Fibroblasten liegen innerhalb von Kollagenfibrillen Mineraldepots. Zwischen den Knochenfragmenten wird durch Granulationsgewebsbrücken der weiche Kallus von peripher beginnend gebildet. Zu dieser Zeit setzt auch der von Matrixproteinen gesteuerte Abbau der avitalen Fragmente durch Osteoklasten ein. Subperiostal beginnt die desmale Ossifikation, eine

direkte Knochenneubildung durch Osteoblasten. Für die folgende Knorpelentstehung bilden sich zusätzlich Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen [130, 136].

Gleichzeitig wird der Frakturspalt als medullärer Kallus mit einem aus dem Markraum in das Frakturhämatom eingewandertem Blastem gefüllt. Nach Rüter et al. [136] und Raschke et al. [130] sind beim Menschen die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel nach etwa 3 bis 8 Wochen weich miteinander verbunden.

Die Granulationsphase geht langsam durch eine zunehmende Mineralisation der Grundsubstanz in die Phase der Kallushärtung über. Das benötigte Kalzium stammt aus Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten. Es entsteht durch enchondrale Ossifikation Geflechtknochen, der im Vergleich zu reifem Lamellenknochen nicht entlang mechanischer Belastungslinien verläuft, sondern entlang neuer Kapillaräste. Gleichzeitig proliferieren frakturspaltfern Osteoblasten, so dass sich Geflechtknochen zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost ablagert [136].

Weiterhin wird während des sogenannten Remodelings überschüssiges Gewebe abgebaut und der entstandene Geflechtknochen entsprechend seiner mechanischen Belastung in lamellären Knochen umgewandelt und damit die normale Knochenstruktur und der ursprüngliche Markraum wiederhergestellt [7, 130, 136].

2.3 Wachstumsfaktoren

Der Knochenaufbau und Knochenabbau wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert.

2.3.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die BMPs wurden 1965 von Urist [168] erstmalig beschrieben. BMPs sind Mitglieder der Transforming Growth Factor- β Superfamilie und nehmen eine Schlüsselrolle im Rahmen

der Frakturheilung ein. So konnte zum Beispiel die osteoinduktive Wirkung von BMP-2 bereits in verschiedenen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden [27, 46]. Mittlerweile ist die Gabe von BMPs ein fester Bestandteil der Pseudarthrosebehandlung beim Menschen [57, 131].

2.3.2 Cystein-rich Protein 61 (CYR 61)

CYR 61, das erstmalig 1990 von O'Brien et al. [120] in Mäusefibroblasten entdeckt wurde, wird der Gruppe der Frühe-Phase-Proteine zugeordnet. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass CYR 61 im Frakturkallus exprimiert wird und die Osteoblastenproliferation und -differenzierung stimuliert. Die Expressierung von CYR 61 korreliert mit der Phase der Chondrogenese und spielt somit eine wichtige Rolle während der enchondralen Ossifikation [72].

2.3.3 Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)

RANKL wurde 1997 entdeckt und ist Mitglied der Familie der Tumornekrosefaktoren [3]. Mit Hilfe von RANKL kann über Receptor Activator of NF- κ B (RANK), den Rezeptor von RANKL, die Knochenresorption über Osteoklasten reguliert werden.

2.3.4 Osteoprotegerin (OPG)

OPG wurde ebenfalls 1997 erstmalig beschrieben und ist der Rezeptorantagonist von RANKL [153]. Ebenfalls der Familie der Tumornekrosefaktoren zugehörig kann es der Entstehung von Osteoklasten durch Hemmung der Differenzierung der Vorläuferzellen entgegenwirken und die Aktivität der Osteoklasten hemmen [179].

2.4 Frakturmodelle

In den letzten Jahren wurde die Knochenbruchheilung mit Hilfe von klinischen Studien und in vitro Studien vielseitig untersucht. Die Knochenheilung stellt jedoch einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher knochenfremder Gewebetypen wie etwa des den Knochen umgebenden Weichteilgewebes, des Periosts, des Gefäßsystems oder des Immunsystems erfordert. Aufgrund des komplizierten Zusammenspiels der verschiedenen Vorgänge der Frakturheilung und der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären “micro-environments” sind in vitro Untersuchungen nicht aussagekräftig. Daher sind Tierversuche eine unabdingbare Voraussetzung für die Untersuchung der Frakturheilung.

Für tierexperimentelle Studien wurden je nach Fragestellung verschiedene Spezies unterschiedlichster Größe und Anatomie verwendet. Ursprünglich wurden fast nur Großtiermodelle, vor allem Schafe und Hunde, zur Untersuchung der Frakturheilung genutzt. Seit einiger Zeit werden jedoch vermehrt Kleintiermodelle verwendet, insbesondere Mausmodelle, da für die Maus ein großes Spektrum an transgenen und Knockout-Stämmen zur Verfügung steht und somit die Möglichkeit gegeben ist, vor allem molekularbiologische Prozesse während der Frakturheilung zu untersuchen.

2.4.1 Großtiermodelle

2.4.1.1 Schaf

Da die Anatomie der Schafe sehr gut mit dem Menschen vergleichbar ist, wurden vor allem für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate diese Modelle verwendet [25, 89]. Die Association for the Study of Internal Fixation untersuchte die Frakturheilung am Schaf mittels Plattenosteosynthese und Schraubenstabilisierung [119, 125, 142]. Ebenso wurden Schafe zur Untersuchung der intramedullären Marknagelung verwendet [140, 141, 156]. Die Mechanismen der primären Knochenheilung wurden für

das Schaf bereits detailliert beschrieben [142]. Aufgrund der hohen Kosten für Zucht und Tierhaltung ist die Verwendung von Schafen als Versuchstiere jedoch limitiert [118].

2.4.1.2 Hund

Die Frakturheilung am Hund ist für die Veterinärmedizin von großer Bedeutung, so dass in tierexperimentellen Publikationen viele Informationen über die biologischen Heilungsabläufe von Frakturen am Hund zu finden sind [86, 117]. Der Hund ist wahrscheinlich das meist genutzte Modell, wenn es um die Untersuchung der Knochenbruchheilung mit Hilfe von internen oder externen Stabilisierungstechniken geht. Ebenso wurden Frakturmodelle ohne interne Stabilisierung als auch Modelle mit verzögerter und ausbleibender Frakturheilung entwickelt [13, 24, 37, 38, 43, 54, 65, 94, 95, 112, 126, 134, 174].

2.4.2 Kleintiermodelle

2.4.2.1 Kaninchen

Das Kaninchen ist ebenfalls ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Frakturheilung [9, 154, 157]. Durch seine Größe können biomechanische Analysen wesentlich einfacher als bei Mäusen oder Ratten durchgeführt werden. So lassen sich Fixateure, Platten, Schrauben oder Verriegelungsnägel ohne großen technischen Aufwand herstellen und auch implantieren [20, 36, 39, 87, 163]. Die Kosten für die systemische Applikation teurer Substanzen sowie die Kosten für Anschaffung und Haltung der Tiere sind im Vergleich zu Großtiermodellen geringer [33].

2.4.2.2 Ratte

Die Ratte wird im Gegensatz zur Maus schon seit längerer Zeit als Frakturmodell verwendet. Zur Untersuchung der Frakturheilung wurden Tibia [2], Femur [66, 169], Schädel [164], Metatarsale [41], Radius [10] und Ulna [1] eingesetzt. Da die Ratte größer

als die Maus ist, ist die operative Versorgung aber auch die biomechanische Knochentestung vereinfacht. Studien mit einer großen Anzahl von Tieren sind kostengünstiger im Vergleich zu Großtiermodellen [118]. Die von Bonnarens und Einhorn [16] verwandten instabilen Pin-Osteosynthesen wurden in den vergangenen Jahren vermehrt durch rotationsstabile Verfahren wie die Verriegelungsmarknagelung, die Plattenosteosynthese oder die Osteosynthese mittels Fixateur externe abgelöst [42, 88, 135, 145, 175, 176].

2.4.2.3 Maus

Die geringen Anschaffungskosten und Haltungskosten der Maus ermöglichen ebenfalls vergleichbar mit Rattenmodellen große Versuchsgruppen. Auch die Anzahl der Publikation mit Frakturmodellen der Maus sind seit dem Jahr 2000 deutlich gestiegen und entsprechen seit dem Jahr 2010 ungefähr der Anzahl der Veröffentlichungen der Frakturmodelle der Ratte [71]. Entscheidend ist jedoch, dass das Genom der Maus komplett entschlüsselt ist und daher eine große Anzahl transgener Stämme und auch spezifische Antikörper zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Frakturheilung zur Verfügung stehen [132]. Der Nachteil der Maus liegt in der primitiven Knochenstruktur mit sogenannten Resorptionskanälen anstatt der Havers-Systeme wie beim Menschen, wobei die Mechanismen sich nicht wesentlich unterscheiden [118].

Bisher wurde die Frakturheilung an der Maus meist an der Rippe, der Tibia und dem Femur untersucht [18, 30, 68, 77, 115, 123, 177]. Untersuchungen an Rippen eignen sich zwar gut zur Untersuchung der Genexpression, jedoch aufgrund ihrer Anatomie nicht für biomechanische Testungen [83, 177].

Zur Untersuchung der Knochenbruchheilung an langen Röhrenknochen unterscheidet man bei der Maus grundsätzlich zwischen geschlossenen und offenen Frakturmodellen [71]. Bei den geschlossenen Modellen wird die Fraktur mittels stumpfer Guillotine erzeugt. Bei den offenen Modellen wird über einen lateralen Zugang der Knochen freipräpariert und anschließend osteotomiert.

Hiltunen et al. [68] etablierten 1993 erstmals ein geschlossenes Modell an der Tibia und konnten so einen transversen Frakturverlauf bei minimalen Weichteilschaden erzeugen.

Im Jahr 2004 veröffentlichten Manigrasso und O'Connor [100] ein vergleichbares Modell für das Femur, das ebenso wie das Modell von Hiltunen et al. [68] auf das 1984 von Bonnarens und Einhorn [16] entwickelte Frakturmodell der Ratte zurückgeht. Das Femur besitzt im Vergleich zur Tibia einen relativ homogenen Querschnitt, was die biomechanische Testung vereinfacht. Im Vergleich zur Tibia, die einen dünnen Weichteilmantel besitzt, eignet sich das Femur auch zur Untersuchung von Weichteiltraumata. Manigrasso und O'Connor [100] stabilisierten die Fraktur mittels intramedullärem Pin (Abb. 1A), der meist aus einer einfachen Spritzkanüle gefertigt wird und geschlossen eingebracht werden kann. Über einen kleinen Hautschnitt medial der Patella wird der Pin über die interkondyläre Notch in den Markraum eingeführt. Im Vergleich zu den neuen Implantaten bietet der Pin keine Rotationsstabilität, weshalb das Implantat nicht für standardisierte Untersuchungen geeignet ist [69].

Ein offenes Frakturmodell am Femur der Maus wurde 2003 von Cheung et al. [28] publiziert. Über einen lateralen longitudinalen Zugang wird der Knochen unter Sicht nach Anlage eines Fixateur externe osteotomiert. Der Fixateur externe (Abb. 1G) besteht aus einem Fixateur-Block und vier Schanzschrauben. Die Stabilisierung mittels Fixateur externe bietet eine hohe Rotationsstabilität [69]. Im Gegensatz zu den geschlossenen Modellen können mit dem Fixateur externe durch die Einstellung verschiedener Spaltgrößen die pathophysiologischen Mechanismen der Pseudarthrose untersucht werden. Ein großer Nachteil dieses Implantats liegt jedoch darin, dass der physiologische Bewegungsablauf des Tieres durch das höhere Implantatgewicht und die exponierte Lage des Implants beeinträchtigt werden kann [28].

Zur Verbesserung der Rotationsstabilität der geschlossenen Frakturmodelle entwickelten Holstein et al. [77] einen Verriegelungsnagel (Abb. 1B). Durch eine beidseitige Abflachung einer 24 Gauge (G) wurde eine zusätzliche Verankerung im Markraum erreicht. Ein weiterer Verriegelungsnagel wurde von Garcia et al. [52] beschrieben (Abb. 1F). Die Verriegelung wird bei diesem Modell über quer zum Knochen verlaufen-

de Pins erreicht, die offen in den Knochen eingebracht werden. Eine zusätzliche axiale Kompression wird über ein Gewinde im proximalen Anteil des Implantats erreicht.

Mit dem Pin-Clip (Abb. 1C) steht ein weiteres offenes Frakturmodell zur Verfügung [52, 53]. Durch die Kombination eines herkömmlichen Pins mit einer extramedullär gelegenen Klammer wird eine hohe Rotationsstabilität erreicht. Ein weiterer Vorteil dieses Implantats liegt darin, dass die Größe des Frakturspaltens definiert werden kann, was die Untersuchung der Pseudarthrose erlaubt.

Bei der intramedullären Zugschraube (MouseScrewTM) (Abb. 1D) wird durch einen distalen Konus, der sich in der Femurkondyle verankert, und ein proximales Gewinde nicht nur eine Rotationsstabilität erreicht, sondern auch eine axiale Stabilität sichergestellt [79]. Die Schraube wird wie der intramedulläre Verriegelungsnagel über einen Führungsdraht nach geschlossener Frakturierung in den Markraum des Femurs eingebracht.

Die winkelstabile Platte (Abb. 1E) wird über einen lateralen Zugang mit vier Schrauben am Knochen fixiert. Durch die spezielle Form der Unterfläche liegt diese nicht direkt dem Knochen an und vermeidet dadurch eine zusätzliche Traumatisierung des Periosts [70, 102]. Die Platte steht als flexibles und rigides Modell zur Verfügung. Vergleichbar mit dem neueren Verriegelungsnagel, dem Pin-Clip und dem Fixateur externe kann auch mit diesem Modell die Defektheilung untersucht werden.

Zur Quantifizierung der Knochenbruchheilung an der Maus wird nach definierten Zeitabschnitten der Knochen explantiert, um anschließend radiologische, biomechanische, histologische und proteinbiochemische Untersuchungen durchzuführen.

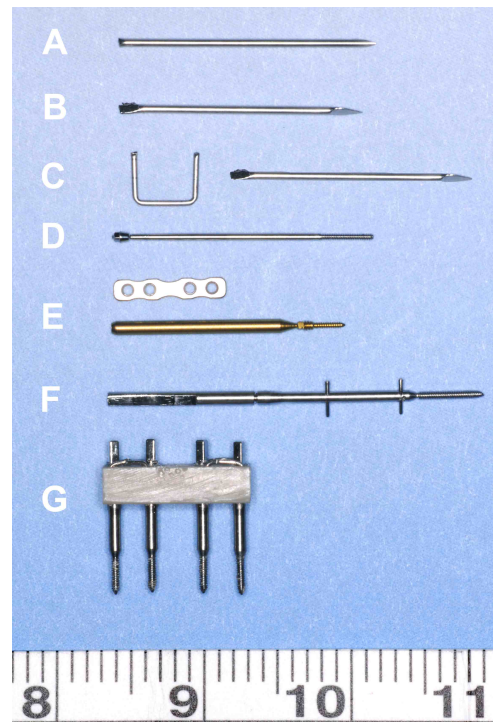


Abb. 1: Osteosynthesetechniken für das Mausfemur: (A) intramedullärer Pin - 24 G Injektionskanüle (B) intramedullärer Verriegelungsnagel - beidseits abgeflachte 24 G Injektionskanüle (C) Pin-Clip - distal abgeflachter Pin und extramedullärer Clip (D) MouseScrew™ - intramedulläre Zugschraube mit distal konusförmigem Kopf und proximalem Gewinde (E) Platte mit Schraube (F) Verriegelungsnagel mit Verriegelungsbolzen (G) Fixateur externe - Fixationsblock und vier Mini-Schanz Schrauben

2.5 Pantoprazol

Pantoprazol gehört zur Gruppe der Protonenpumpeninhibitoren (PPI) und wurde im Jahr 1986 von Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH entwickelt. PPIs gehören zu den am meisten verordneten Medikamenten weltweit. Im Jahr 2009 wurden alleine in Deutschland 1973 Millionen definierte Tagesdosen (DDD) PPIs verabreicht. Im Jahr 2010 waren es bereits 2252,6 Millionen DDD und im Jahr 2011 stieg die Anzahl weiter auf 2568,4 Millionen DDD [109, 110, 111].

2.5.1 Struktur

Pantoprazol ist ein substituiertes Benzimidazol. Es trägt den IUPAC-Namen (R*S*)-5-(Difluormethoxy)-2-[(3,4-dimethoxy-2-pyridyl) methylsulfinyl] benzimidazol und besitzt somit die Summenformel $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ (Abb. 2). Die Molmasse beträgt 383,37 g/mol. Als Arzneimittel wird es in Form von Pantoprazol-Natrium eingesetzt. Es hat dann die Summenformel $C_{16}H_{14}F_2N_3NaO_4S$ und eine Molmasse von 405,35 g/mol. Sein Schmelzpunkt liegt bei circa 139 °C.

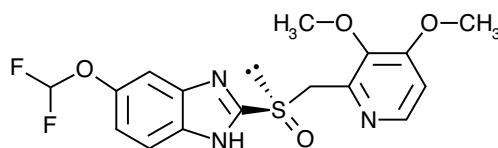


Abb. 2: Struktur des Pantoprazols

2.5.2 Wirkmechanismus

Pantoprazol inhibiert die H^+/K^+ -Adenosintriphosphatase (ATPase) in der Membran der Belegzellen der Magenschleimhaut [48, 80, 91, 137, 138, 151]. Als schwache Basen akkumulieren PPIs in der sauren Umgebung der Belegzellen und werden dort durch Umwandlung zu zyklischen Sulfenamiden aktiviert [48, 91] (Abb. 3). Somit sind alle PPIs sogenannte Prodrugs. Die aus Pantoprazol entstandenen Sulfenamiden binden an Cystein 813 und Cystein 822 der α -Untereinheit der H^+/K^+ -ATPase [150]. In ihrer aktiven Form können PPIs die Membran nicht mehr durchdringen. So inaktivieren sie dosisabhängig durch eine irreversible kovalente Bindung der Cysteinreste die Protonenpumpe [139]. Aus diesem Grund ist die Wirkungsdauer von der benötigten Zeit zur Bildung neuer Protonenpumpen abhängig. Bei Ratten und wahrscheinlich auch beim Menschen werden 20 % der Pumpen innerhalb von 24 Stunden erneuert, wobei zu beachten ist, dass die Synthese der Protonenpumpen nachts höher ist als am Tag [150].

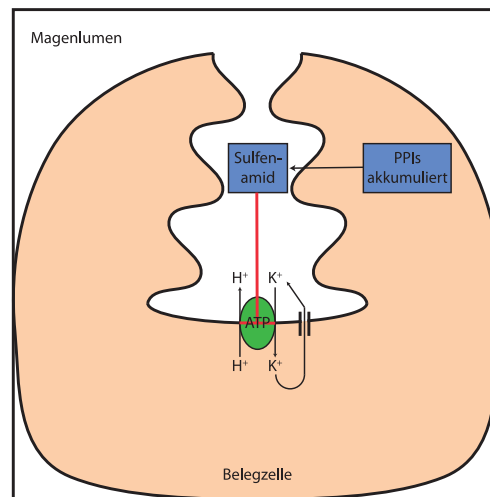


Abb. 3: Wirkmechanismus der PPIs: Die PPIs akkumulieren als schwache Basen in der sauren Umgebung der Belegzellen des Magens und werden dort zu zyklischen Sulfenamiden umgewandelt und damit aktiviert. Die Sulfenamide binden an die H^+/K^+ -ATPase und inaktivieren diese, so dass keine H^+ -Ionen mehr aus den Belegzellen in das Magenlumen gelangen.

2.5.3 Pharmakokinetik

Pantoprazol wird in der sauren Umgebung des Magens schnell abgebaut. Es kann in verschiedenen Darreichungsformen verordnet werden: oral als magensaftresistente Tablette [5] oder zur intravenösen (i.v.) Applikation. Maximale Serumkonzentrationen werden nach 2 bis 3 Stunden erreicht [64, 81, 158]. Die maximale Serumkonzentration korreliert linear mit den einmalig verabreichten Pantoprazol-Dosen nach oraler [158] und i.v.-Gabe [15]. Laut Hartmann et al. [64] und Tanaka et al. [158] gibt es bei den maximalen Serumkonzentrationen nach einmaliger beziehungsweise mehrmaliger Gabe keinen signifikanten Unterschied. Pue et al. [129] zufolge weist Pantoprazol eine Bioverfügbarkeit von 77 % auf. Die Serumproteinbindung liegt bei ungefähr 98 %, das Verteilungsvolumen bei 0,15 bis 0,17 l/kg, abhängig von der Hauptlokalisation von Pantoprazol im extrazellulären Wasser [48, 81, 129].

Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich über die Leber, geringe Anteile werden unverändert renal ausgeschieden [104, 158]. Dabei wird die aktive Form vorzugsweise über das Cytochrom P (CYP) Isoenzym 2C19 in die inaktive Form Hydroxypantoprazol umgewandelt [104, 159]. Ungefähr 80 % einer oralen oder i.v.-Dosis werden

als Pantoprazol-Metaboliten renal ausgeschieden, der Rest über die Faeces mittels biliärer Sekretion [81]. Laut Studien reicht die Clearance von 0,7 bis 1,3 l/h/g, die terminale Eliminationshalbwertszeit von 0,9 bis 1,9 Stunden [48, 64, 81, 129, 158]. Dabei ist zu beachten, dass laut Huber et al. [81] und Bliesath et al. [15] die Halbwertszeit als auch die Plasmaclearance dosisunabhängig sind. Bei Menschen mit fehlerhafter CYP2C19-Funktion ist die Metabolisierung von Pantoprazol verlangsamt, so dass die Eliminationshalbwertszeit auf 6 bis 9 Stunden ansteigen kann [6, 104, 158, 159].

Die Elimination ist weder bei Niereninsuffizienz noch bei Hämodialyse signifikant verändert, so dass keine Dosisanpassungen nötig sind [90]. Bei Patienten mit starker Leberzirrhose kommt es aufgrund einer langsameren Metabolisierung zu Serumhalbwertszeiten von 7 bis 9 Stunden [81].

2.5.4 Indikation und Anwendung

PPIs sind nach Shi und Klotz [149] das Mittel der Wahl zur Therapie der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) und Ulcus duodeni beziehungsweise Ulcus ventriculi, zur Eradikation von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), beim Zollinger-Ellison-Syndrom sowie zur Prophylaxe von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) induzierter Ulcera.

Nach Vakil et al. [171] ist das Ziel bei der Behandlung der GERD die Beschwerdelinderung, die Erhaltung der Lebensqualität, die Heilung der Ösophagitis und die Reduktion des Risikos für Komplikationen. Bei der GERD sind PPIs der Goldstandard, da sie potenter als H₂-Rezeptor-Antagonisten sind [106, 127, 128]. Dabei liegen die Heilungschancen je nach verabreichter Dosis und Therapielänge zwischen 50 % und 90 % [59, 61, 144].

Die Therapie für das Ulcus duodeni und Ulcus ventriculi basiert auf zwei Säulen, zum einen auf der Hemmung der Magensäuresekretion, zum anderen auf der Eradikation des *H. pylori*. Der Goldstandard mit Heilungsraten von 80 % bis 90 % zur Eradikation des *H. pylori* ist eine Tripletherapie mit einem PPI, Amoxicillin und Clarithromycin

oder Metronidazol [29, 51, 99]. Jedoch gibt es noch keinen Konsens zur optimalen Therapielänge (7, 10 oder 14 Tage), wobei Studien zeigen, dass eine Therapie länger als 7 Tage wenig Nutzen hat [22, 49, 58, 103].

Beim Zollinger-Ellison Syndrom kommt es durch eine vermehrte Gastrinbildung in Folge von sogenannten Gastrinomen zu einer erhöhten Magensäureproduktion und somit zu intestinalen Ulcerationen. Durch die Gabe von PPIs kann die Magensäuresekretion effektiv inhibiert werden [85].

Die Einnahme von NSARs kann zu gastrointestinalen Läsionen führen und somit zu einem erhöhten Risiko für ernsthafte gastrointestinale Komplikationen. Dabei erhöht sich das Risiko weiter bei gleichzeitiger Einnahme von NSAR und der Einnahme von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure sowie einer Ulceration oder einer oberen gastrointestinalen Blutung in der Anamnese oder einem Alter von mehr als 70 Jahren [8, 92]. Aus diesem Grund sollten begleitend zur NSAR-Therapie PPIs verordnet werden, da diese zu einer effektiven Säurehemmung führen und somit die mit gastrointestinalen Läsionen verbundene Morbidität und Mortalität vermindern können [107, 114].

2.5.5 Nebenwirkungen

PPIs sind in aller Regel gut verträglich. Als häufigste Nebenwirkungen werden in der Literatur Diarrhoe (1,5 %), Kopfschmerzen (1,3 %), Schwindel (0,7 %) und Pruritus (0,5 %) beschrieben [48]. Des Weiteren konnten Lewis et al. [96] zeigen, dass eine starke Hemmung der Säuresekretion zu einer Bakterienbesiedlung des Magens führt. Laut Neal et al. [116] ist die Inzidenz von *Campylobacter jejuni* Enteritiden durch Inhibition der Protonenpumpe leicht erhöht. Außerdem werden in der Literatur erhöhte Transaminasen (0,1-1 %), Flatulenz (0,1-1 %), Thrombozytopenien (< 0,01 %), Leukopenien (< 0,01 %) und Angioödeme (< 0,01 %) beschrieben.

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit die Behandlung mit Pantoprazol die Frakturheilung im Tiermodell beeinflusst.

2.7 Fragestellung

Die Nullhypothese lautet:

“Die Frakturheilung wird durch die Gabe von Pantoprazol nicht beeinflusst”.

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

Im Folgenden werden die Methoden, die zur Durchführung der Arbeit angewandt wurden, beschrieben.

3.1.1 Studiendesign

Die Tierversuche mit der Versuch-Nr. 31/2009 wurden von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen - Zentralstelle -, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Studie wurden insgesamt 48 Mäuse untersucht. Dazu wurde täglich 24 Tieren Pantoprazol intraperitoneal (i.p.) und 24 Kontrolltieren eine entsprechende Menge isotone Natriumchloridlösung i.p. verabreicht. 2 bzw. 5 Wochen nach Frakturierung und osteosynthetischer Versorgung erfolgte die entsprechende Auswertung durch radiologische, biomechanische, histomorphometrische und proteinbiochemische Methoden (Tab. 1). Zur Reduktion der benötigten Tierzahl wurden die radiologischen, biomechanischen und histologischen Untersuchungen jeweils am gleichen Versuchstier durchgeführt.

	Pantoprazol		Kontrolle	
	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Radiologie	n = 8	n = 10	n = 9	n = 10
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 7	n = 8
Histomorphometrie	n = 8	n = 9	n = 9	n = 5
Western-Blot	n = 5	∅	n = 5	∅

Tab. 1: Studiendesign. Anzahl der Tiere in den einzelnen Auswertungsgruppen

3.1.2 Tiermodell

Zur Untersuchung des Einflusses von Pantoprazol auf die Frakturheilung wurden ausgewachsene, 12 bis 14 Wochen alte, CD-1 Mäuse mit einem mittleren Gewicht von $34,1 \pm 0,5$ g (Pantoprazol-Gruppe: $33,5 \pm 0,5$ g; Kontrollgruppe: $34,4 \pm 0,8$ g) verwendet. Die Tierhaltung erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22 bis 24 °C, relative Luftfeuchte: 60 %) bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus. Wasser sowie Standarddiätfutter (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden in Pelletform ad libidum bereitgestellt.

Zur osteosynthetischen Versorgung wurde eine intramedulläre Zugschraube, die sogenannte MouseScrew™ (RISystem AG, Davos, Schweiz), die aus medizinischem Stahl gefertigt wurde, verwendet (Abb. 4) [79]. Die Schraube (Länge: 17,2 mm, Durchmesser: 0,5 mm) besitzt einen distalen Konus (Durchmesser: 0,8 mm), der sich in den Kondylen des distalen Femurs verankert, sowie ein proximales Gewinde (Länge: 4 mm, Durchmesser: 0,5 mm) mit einer Bohrung zum Einbringen des Führungsdrahtes, das eine Frakturspaltkompression erlaubt.

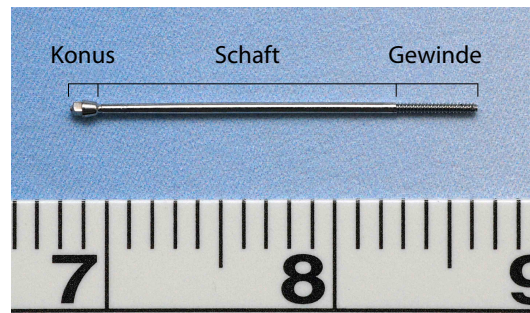


Abb. 4: MouseScrew™ - Länge: 17,2 mm, Durchmesser: 0,5 mm, Material: medizinischer Stahl

3.1.3 Operationsverfahren

Die Versuche wurden in den Räumlichkeiten des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in gleicher standardisierter Technik durchgeführt.

Die Mäuse wurden mittels einer i.p. Injektion von 15 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin (Rompun® 2% - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 75 mg/kg KG Ketamin (Ursostamin® 100mg - Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) narkotisiert. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe - Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Hornhaut aufgetragen. Die Haare am rechten Bein wurden mittels elektrischer Trockenrasur und Enthaarungscreme (elca-med® - ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) entfernt.

Das rechte Bein wurde während der Operation mit dem linken Daumen, Zeigefinger und Ringfinger fixiert (Abb. 5). Nach sorgfältiger Hautdesinfektion mit Softasept® N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Haut medial der Patella 6 mm lang mittels einer Skalpellklinge (Carbon Steel Skalpellklingen #15 - Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland) inzisiert (Abb. 6). Die Kniegelenkscapsel wurde anschließend eröffnet, so dass die Patella zuerst mit einem Wattetupfer mobilisiert und anschließend nach lateral luxiert werden konnte. So konnten die Femurkondylen dargestellt werden (Abb. 7). Der Markraum wurde über der Fossa intercondylaris mit

einer 24 G Spritzkanüle (BD Microlance 3™ - 24 G 1" - Nr. 17, Ø 0,55 x 25 mm - BD Drogheda, Ireland) (Abb. 8) eröffnet und der Trochanter major mit dieser Kanüle retrograd über den Markraum durchbohrt. Im Anschluss wurde die Haut retrograd über den Markraum mit einer 27 G Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie- O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie- Größe 30/42- G 27 x 1½" / Ø 0,40 x 40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) durchstoßen (Abb. 9). In die Injektionskanüle wurde anschließend ein 0,2 mm Wolfram-Draht (Goodfellow Cambridge Limited, Huntigdon, England) eingeführt und die Kanüle entfernt, wobei der Draht so im Femur verblieb, dass er sowohl am Rücken aus der Haut als auch aus beiden Kondylen etwa 1 cm herausragte (Abb. 10). Daraufhin wurde der Knochen mit einer 3-Punkt-Biege-Apparatur geschlossen frakturiert (Typ A2 bis A3 nach AO-Klassifikation [113]) (Abb. 11) und die MouseScrew™ [79] über den zuvor positionierten Draht mit Hilfe eines Schraubendrehers implantiert (Abb. 12). Sobald die Schraube im proximalen Ende im Bereich der Kondylen fest verankert war und der Konus sich im Bohrloch verhakte, brach sie an der Sollbruchstelle ab (Abb. 13). Abschließend wurde die Patella reponiert und die Gelenkkapsel mit einem 5-0 Prolene®-Faden (Ethicon Inc., Somerville, USA) verschlossen (Abb. 14), sowie die Hautnaht mittels 5-0 Prolene®-Faden durchgeführt (Abb. 15). Die einzelnen OP-Schritte (Drahteinführung, Fraktur, Schraubenimplantation) wurden mittels Röntgenaufnahmen kontrolliert (Abb. 16-18).

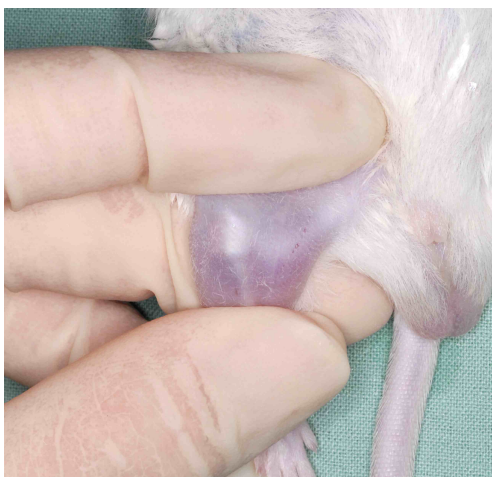


Abb. 5: Fixation des Beins während der OP

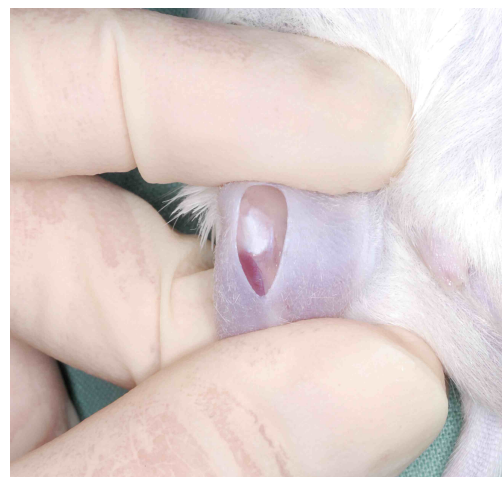


Abb. 6: Mediopatellare Hautinzision mit Darstellung der Patellarsehne



Abb. 7: Lateral luxierte Patella mit Sicht auf die Kondylen

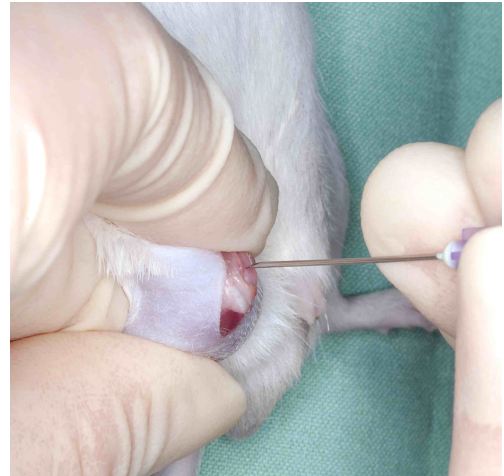


Abb. 8: Eröffnen des Markraums über die Fossa intercondylaris



Abb. 9: Führungskanüle

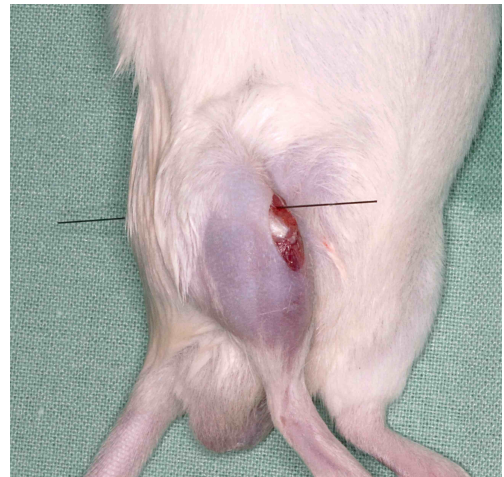


Abb. 10: Führungsdraht (Wolfram-Draht)



Abb. 11: Geschlossene Frakturierung mittels 3-Punkt-Biegung

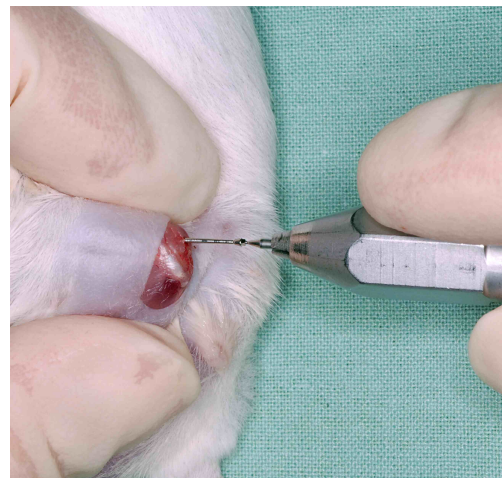


Abb. 12: Implantation der MouseScrew™



Abb. 13: Implantierte MouseScrew™

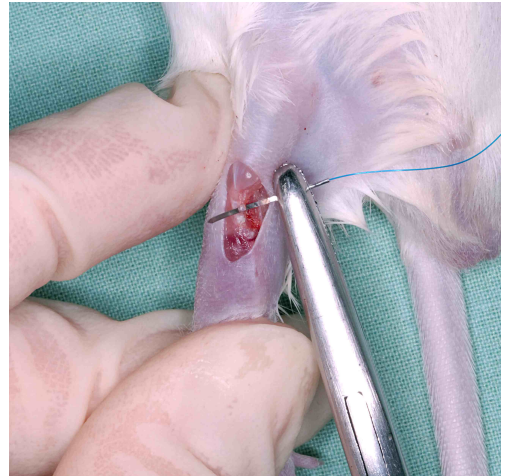


Abb. 14: Refixierung der Patella

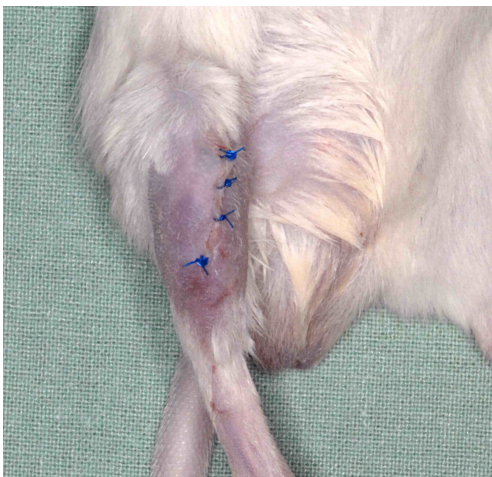


Abb. 15: Hautnaht



Abb. 16: Röntgenkontrolle Führungsdraht

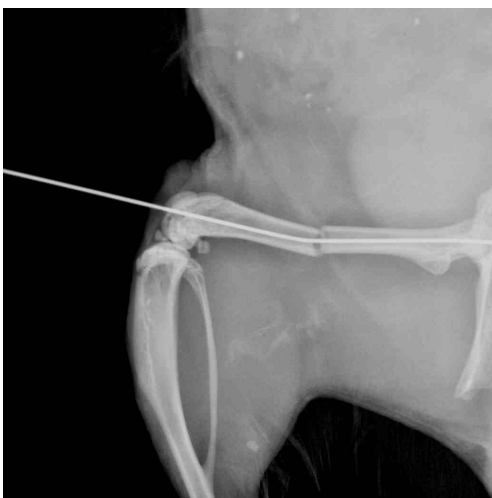


Abb. 17: Röntgenkontrolle nach Fraktur-
zeugung



Abb. 18: Postoperative Röntgenkontrolle

3.1.4 Medikamentenapplikation

Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde den Tieren täglich über 2 beziehungsweise 5 Wochen 100 mg/kg KG Pantoprazol (Pantozol® i.v. 40 mg - Nycomed GmbH, Konstanz, Deutschland) i.p. respektive den Kontrolltieren eine entsprechende Menge isotone Natriumchlorid-Lösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) i.p. verabreicht.

3.1.5 Tötung der Tiere

Die Tiere wurden 2 beziehungsweise 5 Wochen postoperativ nach vorheriger Narkotisierung nochmals geröntgt (Abb. 19). Anschließend wurden die Tiere zum Ausbau der Femora durch Genickbruch getötet.



Abb. 19: Röntgenbild 2 Wochen postoperativ

3.1.6 Präparation der Knochen

Zur anschließenden Auswertung wurden beide Femora explantiert. Dazu wurde die Haut über dem Tibiaplateau im Verlauf des Femurs eröffnet. Die Patellarsehne sowie die angrenzende Muskulatur wurden mit einem Skalpell durchtrennt und bis zum Becken abpräpariert. Die Hüftkapsel wurde eröffnet, so dass man den Femurknochen exartikulieren konnte. Dann wurden die Weichteile vom Knochen reseziert (Abb. 20). Abschließend wurde beim geheilten Knochen mittels Ausdrehinstrument das Implantat vorsichtig entfernt. Zur Vermeidung einer Austrocknung der Femora wurden diese

kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befeuchtet und nach erfolgtem Ausbau in feuchte Kompressen eingewickelt.



(a) Explantierter Knochen



(b) Frakturzone mit Kallusgewebe

Abb. 20: Explantierter Knochen nach zweiwöchiger Frakturheilung

3.2 Zielkriterien und Auswertung

3.2.1 Radiologie

Nach 2 und 5 Wochen Frakturheilung wurden von beiden Femora digitale dorso-ventrale Röntgenbilder (Abb. 21) angefertigt (Belichtungszeit 10 s, Spannung 26 kV) (MX-20 - Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1 - Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA). Die radiologische Auswertung erfolgte mittels Goldberg-Score [60]. Dazu wurde ein Punktesystem verwendet, das die knöcherne Überbrückung nach jeweils 2 beziehungsweise 5 Wochen beurteilte (Tab. 2).

Score	Bedeutung
0	ausbleibende knöcherne Überbauung, Frakturspalt einsehbar
1	partielle Überbauung
2	knöcherne Überbauung

Tab. 2: Goldberg-Score

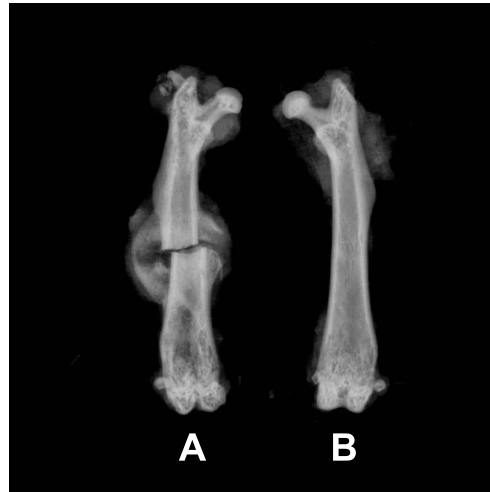


Abb. 21: Röntgenbild zur radiologischen Auswertung nach zweiwöchiger Frakturheilung. (A) Frakturknochen (B) kontralateraler, gesunder Knochen

3.2.2 Biomechanik

Zur biomechanischen Testung wurden nach der Präparation der Femora die Implantate entnommen. Die Kallussteifigkeit [N/mm] wurde zerstörungsfrei mittels 3-Punkt-Biege-Testung (Mini-Zwick Z 2.5 - Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) gemessen (Abb. 22A). Das gesunde Femur diente jeweils als interne Kontrolle, so dass die Steifigkeit des frakturierten Knochens in Prozent zum jeweiligen gesunden Knochen als auch absolut angegeben wurde. Um standardisierte Versuchsbedingungen einzuhalten, wurden die Femora jeweils mit der ventralen Seite nach unten in die Prüfvorrichtung gelegt. Der Abstand der beiden Stempel betrug 6 mm. Anschließend wurde die Messung mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min durchgeführt. Die Biegesteifigkeit wurde im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt (Abb. 22B).

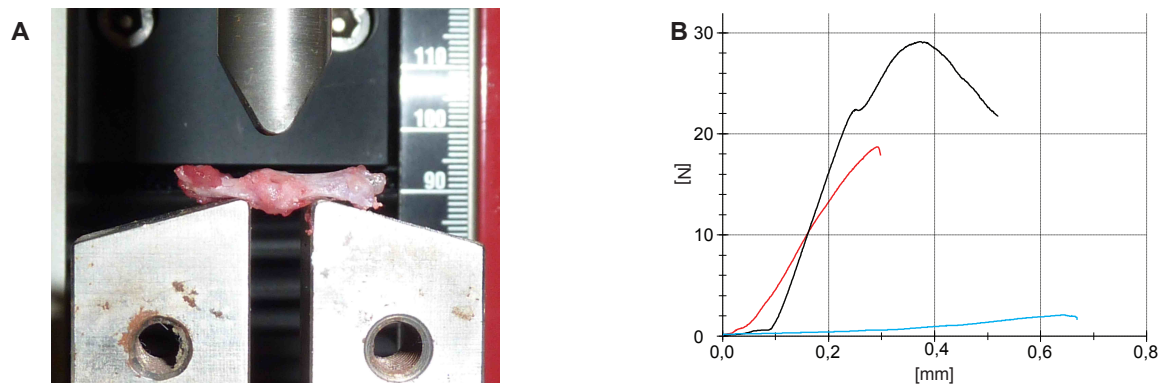


Abb. 22: Biomechanische Auswertung: Bestimmung der Knochensteifigkeit mittels 3-Punkt-Biegung. (A) Testapparatur. (B) Kraft-Weg-Diagramm: Kontrolle (schwarz). 2 (blau) und 5 (rot) Wochen nach Gabe von Pantoprazol.

3.2.3 Histologie

Zur quantitativen Messung der Kallusgröße und Analyse der Gewebezusammensetzung wurden die Knochen nach der biomechanischen Testung 12 bis 24 Stunden in Zink-Lösung (ICH Zinc Fixative - BD Biosciences Pharmingen™, San Jose, CA, USA) fixiert, anschließend 14 Tage in 13%iger EDTA-Lösung bei 4 °C entkalkt. Im Anschluss wurden die entkalkten Knochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Daraufhin wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, damit das Gewebe paraffingängig wird. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in heißem Paraffin eingebettet. Für die histologische Analyse wurden 5 µm dicke Schnitte im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in sagittaler, longitudinaler Schnittführung angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte nach der trichromen Masson-Goldner Methode (siehe 3.2.3.1, Abb. 23) eingefärbt sowie Schnitte mit tartrate resistant acid phosphatase-(TRAP) Färbung (siehe 3.2.3.2) angefertigt. Die Digitalisierung (Zeiss Axio Vision 3.1 und Zeiss Axio Cam - Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) der histologischen Schnitte erfolgte bei 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope - Olympus, Tokio, Japan). Die digitalen Bilder wurden mit einem Bildbearbeitungsprogramm (ImageJ Analysis System, U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) analysiert. Es wurden folgende

Parameter ausgewertet:

- Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspalts [mm]
- Kallusdurchmesser in Höhe des Frakturspalts [mm]
- periostale Kallusfläche [mm²]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm²]

In Anlehnung an die Nomenklatur von Gerstenfeld et al. [55] wurden folgende Zielwerte berechnet:

- $\frac{\text{Gesamt-Kallus-Fläche (Knochen, Knorpel und fibröse Kallus-Fläche) (CAr)}}{\text{Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspalts (BDm)}} [mm]$
- $\frac{\text{Kallusdurchmesser (CDm)}}{\text{Femurdurchmesser (BDm)}}$
- $\frac{\text{Knochenfläche innerhalb der Kallusregion (TOTAr)}}{\text{Gesamt-Kallus-Fläche (CAr)}} [\%]$
- $\frac{\text{Knorpelfläche innerhalb der Kallusregion (CgAr)}}{\text{Gesamt-Kallus-Fläche (CAr)}} [\%]$
- $\frac{\text{Bindegewebsfläche innerhalb der Kallusregion (FTAr)}}{\text{Gesamt-Kallus-Fläche (CAr)}} [\%]$

Des Weiteren wurden beide Kortices unabhängig voneinander bezüglich der Gewebeart im Frakturspalt mit einem Punktesystem zur Bestimmung der Kallusqualität bewertet [53]. Die Punkte beider Kortices wurden anschließend addiert, sodass maximal 4 Punkte erreicht werden konnten (Tab. 3).

Score	Bedeutung
0	bindegewebige Überbrückung des Frakturspalts
1	knorpelige Überbrückung des Frakturspalts
2	knöcherne Überbrückung des Frakturspalts

Tab. 3: Histo-Score zur Bewertung der Kallusqualität

3.2.3.1 Trichrome Masson-Goldner-Färbung

Durch die trichrome Masson-Goldner-Färbung können die verschiedenen Gewebe farblich dargestellt werden. Die Färbung wird wie folgt durchgeführt:

Das Präparat wird 1 bis 2 Minuten mit Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt und dann 10 bis 15 Minuten mit fließendem Wasser gespült. Anschließend wird das Präparat für 5 bis 7 Minuten mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt, danach mit einprozentiger Essigsäure abgespült und einige Minuten in Molybdatophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes differenziert. Danach wird das Präparat nochmals kurz mit einprozentiger Essigsäure abgespült und für 5 Minuten mit Lichtgrün gegengefärbt. Abschließend wird es 5 Minuten mit einprozentiger Essigsäure ausgewaschen, rasch in Isopropanol entwässert, kurz in Xylol geschwenkt und in Einschlussharz eingebettet.

Bei der Masson-Goldner-Färbung stellen sich die einzelnen Strukturen wie folgt dar (Tab. 4):

Gewebestruktur	Farbe
Zytoplasma	hellorange bis rot
Erythrozyten	orangerot
Muskelgewebe	blassrot
mineralisierter Knochen	leuchtend grün
kollagenes Bindegewebe	grün

Tab. 4: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten bei der trichromen Masson-Goldner-Färbung

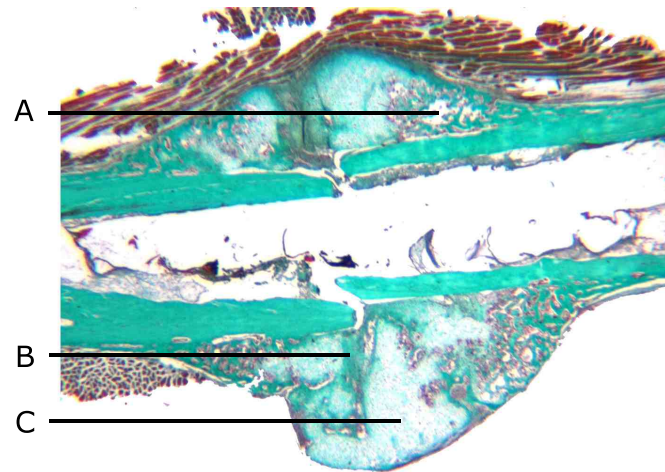


Abb. 23: Sagittaler, longitudinaler Schnitt durch das Femur (Trichrome Masson-Goldner-Färbung): (A) Bindegewebe (B) Knochen (C) Knorpel

3.2.3.2 TRAP-Färbung

Zur quantitativen Analyse der Osteoklasten wurde eine TRAP-Färbung 2 und 5 Wochen postoperativ durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, 5 Minuten mit Aqua destillata (A. dest) gespült und anschließend in 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0) 20 Minuten inkubiert. Danach wurden pro Schnitt 500 µl der aus 10 ml 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 5,0), 5 mg Naphtol AS-MX Phosphat und 11 mg 4-Chloro-2-methylbenzenediazonium Salz bestehenden TRAP-Färbelösung aufgetragen und die Schnitte 1 bis 4 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach einer Stunde wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. Nach abgeschlossener Färbung erfolgte die Spülung mit A. dest sowie die Kernfärbung mit Mayers Hämalaun. Abschließend wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt.

Zur Auswertung 2 Wochen postoperativ wurden insgesamt 11 High-Power-Fields (HPF) definiert und bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. 5 Wochen postoperativ wurden bei verminderter Kallusgröße insgesamt 7 HPFs definiert (Abb. 24). Angegeben wurden die Anzahl der Osteoklasten pro HPF. Zudem wurde die Anzahl der Osteoklasten im Knochen und Knorpelgewebe getrennt betrachtet.

Als Osteoklasten wurden TRAP-positive Zellen, die drei oder mehr Zellkerne aufwiesen,

detektiert (Abb. 25).

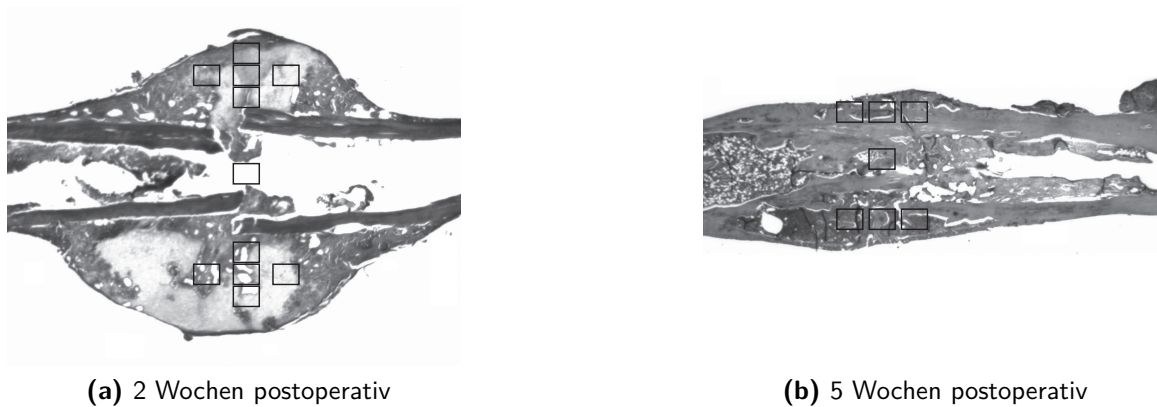


Abb. 24: HPF zur Auswertung der TRAP-positiven Zellen

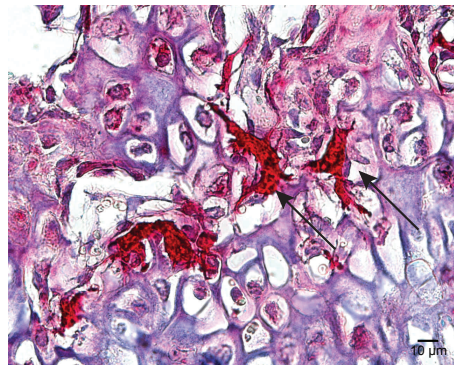


Abb. 25: TRAP-positive Osteoklasten 2 Wochen postoperativ

3.2.4 Western Blot

Mittels Western Blot Analyse wurde die Proteinexpression im Kallusgewebe nach zweiwöchiger Frakturheilung bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Beurteilung des Knochenmetabolismus die Expression folgender Marker bestimmt: BMP-2, BMP-4, CYR 61, PCNA, RANKL, OPG (Tab. 5). War das Tier der Western Blot Gruppe zugehörig, wurde nur der geheilte Knochen explantiert. Dazu wurde nach Resektion des Weichteilgewebes der Kallus, bestehend aus knöchernem, knorpeligem und bindegewebigem Anteil, entfernt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur Analyse kryokonserviert.

Protein	Funktion
BMP-2	Knochenformationsmarker
BMP-4	Knochenformationsmarker
CYR 61	Knochenformationsmarker
PCNA	Proliferationsmarker
RANKL	Stimulation der Osteoklastogenese
OPG	Inhibition der Osteoklastogenese

Tab. 5: Übersicht über die analysierten Proteine und deren Funktion

Das Kallusgewebe wurde in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100, 0,02 % NaN₃, 0,2 mM PMSF, und Protease Inhibitor Cocktail (1:100 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) homogenisiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Lowry bestimmt. Die komplette Proteinprobe (10 µg Protein pro Bahn) wurde diskontinuierlich auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel getrennt und auf Polyvinylendifluorid-Membranen übertragen. Nachdem die nicht-spezifische Bindungsseite blockiert wurde, wurden die Membranen für 4 Stunden zunächst mit den folgenden Antikörpern inkubiert: Rabbit Anti-Mouse BMP-2 und Rabbit Anti-Mouse BMP-4 (1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), Goat Anti-Mouse CYR 61 (1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), Mouse Anti-Mouse PCNA (1:500, Dako Cytomation, Hamburg, Germany), Mouse Anti-Mouse RANKL (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und abschließend mit für 1,5 Stunden mit corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary Antibodies (1:5000, GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland). Die Proteinexpression wurde mittels Luminol-enhanced Chemiluminescence (ECL, GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Signale wurden densitometrisch gemessen (Quantity one, Geldoc, BioRad, München, Deutschland) und um ungleiche Beladung zu korrigieren, an das α -tubulin-Signal (1:20,000, anti- α -tubulin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angepasst.

Da nach fünfwöchiger Frakturheilung nur noch sehr wenig Kallusgewebe vorhanden war, wurde auf eine Analyse nach diesem Zeitraum verzichtet [78].

3.3 Statistik

Alle statistischen Daten wurden im Text als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und der Varianzgleichheit (F-Test) wurde der Gruppenvergleich mittels Student's t-Test durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Gruppenstatistik mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Statistik wurde mit Hilfe von GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt. Es wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

4 Ergebnisse

4.1 Radiologie

Die radiologische Auswertung 2 Wochen postoperativ mittels Goldberg-Score (Tab. 2) zeigte, dass der Frakturspalt in der Pantoprazolgruppe nicht knöchern überbaut war ($0,4 \pm 0,2$). Im Vergleich dazu zeigte sich in der Kontrollgruppe eine partielle Überbauung ($0,9 \pm 0,3$), wobei die Unterschiede nicht signifikant waren ($p > 0,05$).

Nach fünfwöchiger Frakturheilung waren in beiden Gruppen fast alle Knochen radiologisch verheilt ($1,7 \pm 0,2$ versus (vs.) $1,8 \pm 0,1$). Es bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (Abb. 26).

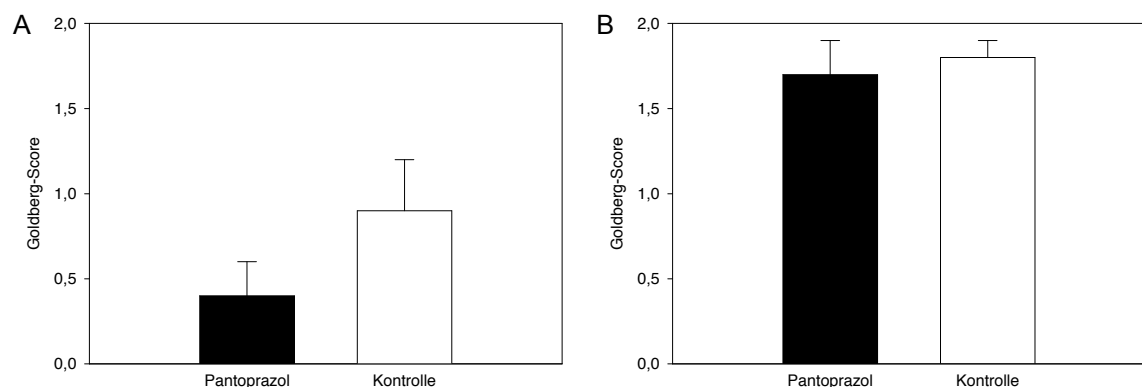


Abb. 26: Ergebnisse der radiologischen Auswertung des Goldberg-Score: Ausbleibende knöcherne Überbauung (0 Punkte). Partielle Überbauung (1 Punkt). Knöcherne Überbauung (2 Punkte). (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM

4.2 Biomechanik

Die Biegeteifigkeit wurde mittels 3-Punkt-Biegung bestimmt. Die Ergebnisse sind als Absolutwerte [N/mm] dargestellt sowie in Prozent [%] zum gesunden Knochen um individuelle Unterschiede der Knochen zwischen den Versuchstieren zu berücksichtigen.

Die biomechanische Auswertung 2 Wochen postoperativ zeigte nach Behandlung mit Pantoprazol sowohl gemessen in Absolutwerten als auch in Prozent zum kontralateralen Knochen eine niedrigere Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. In der Pantoprazolgruppe wurde ein MW von $5,3 \pm 0,8$ N/mm gemessen. In der Kontrollgruppe wurden deutlich höhere Biegesteifigkeiten ermittelt ($8,2 \pm 2,7$ N/mm, $p > 0,05$). Analog dazu wurde in der Pantoprazolgruppe eine relative Biegesteifigkeit von $4,3 \pm 0,7$ % ermittelt. Im Vergleich konnten in der Kontrollgruppe eine relative Biegesteifigkeit von $7,0 \pm 2,1$ % errechnet werden ($p > 0,05$) (Abb. 27, 28).

In der späten Phase der Frakturheilung (5 Wochen postoperativ) zeigte sich eine signifikant geringere absolute Biegesteifigkeit nach Pantoprazolgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Durchschnitt wurde in der Pantoprazolgruppe eine absolute Biegesteifigkeit von $71,0 \pm 6,6$ N/mm erreicht. In der Kontrollgruppe wurden durchschnittliche Werte von $100,2 \pm 10,3$ N/mm ermittelt ($p < 0,05$). Beim Vergleich der relativen Biegesteifigkeit bestätigte sich der oben genannte signifikante Unterschied. Die mit Pantoprazol behandelten Tiere wiesen eine signifikant verminderte relative Biegesteifigkeit auf ($55,7 \pm 4,9$ % vs. $85,7 \pm 10,1$ %, $p < 0,05$) (Abb. 27, 28).

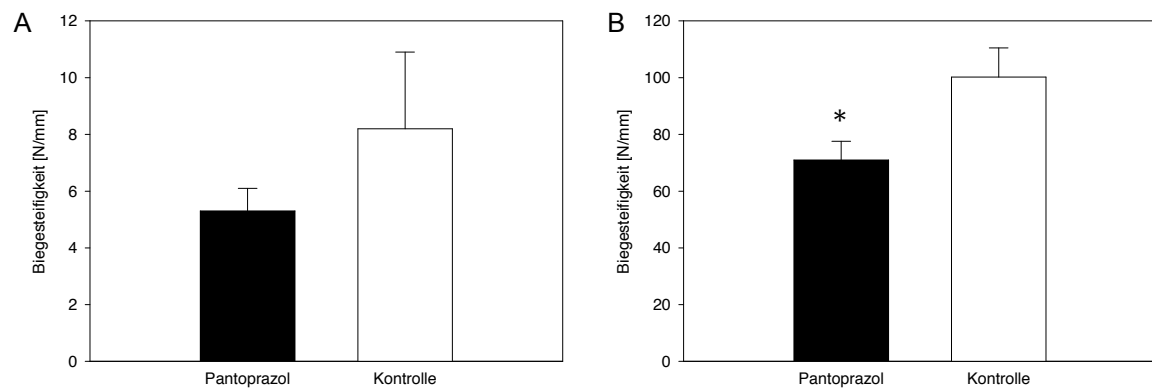


Abb. 27: Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

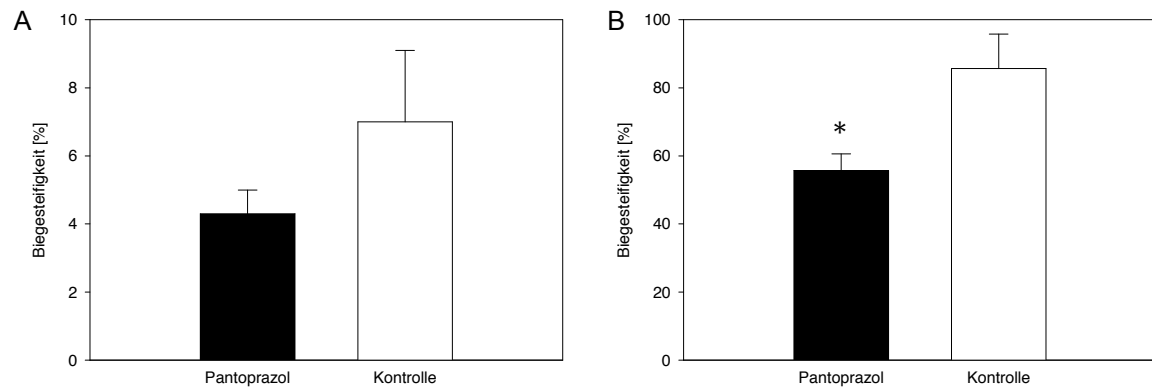


Abb. 28: Relative Biegesteifigkeit des frakturierten Knochen. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Biegesteifigkeit des nicht frakturierten Beines war sowohl nach zweiwöchiger Pantoprazol-Behandlung ($129,8 \pm 9,6$ N/mm vs. $115,0 \pm 8,6$ N/mm) als auch nach 5 Wochen ($129,6 \pm 8,2$ N/mm vs. $120,8 \pm 9,4$ N/mm) nicht signifikant verändert ($p > 0,05$) (Abb. 29). Pantoprazol hat somit keinen Einfluss auf den gesunden Knochen.

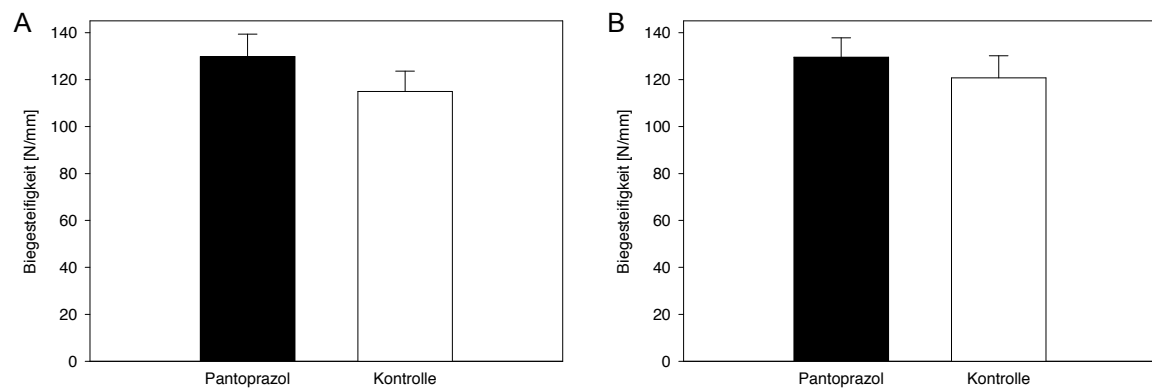


Abb. 29: Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Knochen. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM

4.3 Histologie

Die histomorphometrische Analyse des Frakturkallus wurde am sagittalen, longitudinalen Schnittpräparat im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers durchgeführt. Um individuelle Unterschiede in Bezug auf die Kallusfläche zwischen den Versuchstieren zu berücksichtigen, wurde die Kallusfläche zusätzlich in Relation zum jeweiligem Femurdurchmesser angegeben.

Bezüglich der Analysen der Kallusfläche in Bezug zum Femurdurchmesser zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen. 2 Wochen postoperativ konnte für die Pantoprazolgruppe eine Kallusfläche relativ zum Femurdurchmesser von $4,3 \pm 0,3$ mm im Vergleich zur Kontrollgruppe von $4,7 \pm 0,6$ mm ermittelt werden ($p > 0,05$). Nach 5 Wochen wurden in beiden Gruppen entsprechend dem stattgehabten Remodeling-Prozess eine wesentlich kleinere Kallusfläche gemessen. Nach dieser Zeit betrug die Kallusfläche in Bezug zum Femurdurchmesser $2,0 \pm 0,4$ mm bei den Pantoprazol behandelten Tieren und $1,9 \pm 0,3$ mm in der Kontrollgruppe ($p > 0,05$) (Abb. 30).

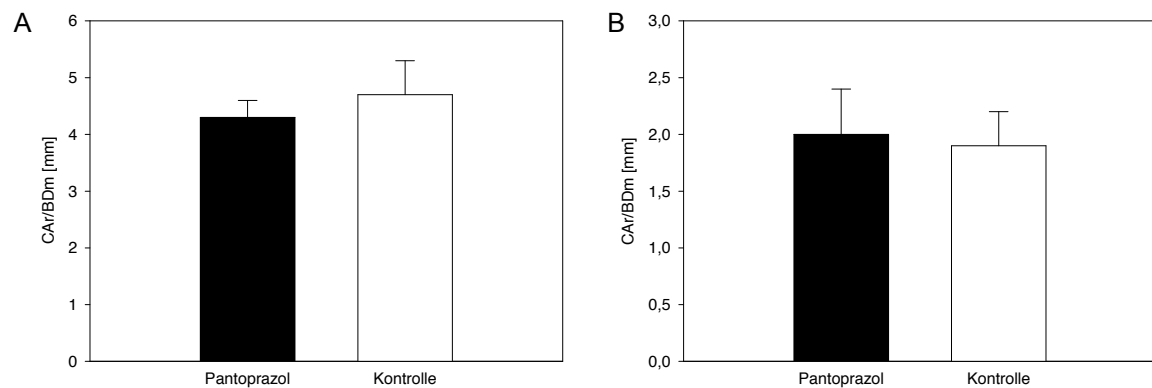


Abb. 30: Periostale Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspalts. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM

Die Analyse der Gewebezusammensetzung innerhalb der periostalen Kallusfläche 2 Wochen postoperativ zeigte einen vergleichbaren Knochenanteil in der Pantoprazolgruppe zur Kontrollgruppe ($53,0 \pm 5,1$ % vs. $44,6 \pm 3,7$ %, $p > 0,05$). Auch hinsichtlich des prozentualen Anteils des gebildeten Knorpels und Bindegewebes im Gruppenvergleich konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Knorpel: $39,2 \pm 4,4$ % vs. $40,8 \pm 4,3$ %, $p > 0,05$. Bindegewebe: $7,8 \pm 1,1$ % vs. $14,6 \pm 2,8$ %, $p > 0,05$) (Abb. 31-33).

5 Wochen postoperativ konnte in der Pantoprazolgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant höherer Anteil Knorpelgewebe ($7,8 \pm 4,2$ % vs. $0,5 \pm 0,2$ %, $p < 0,05$) und Bindegewebe ($3,6 \pm 1,4$ % vs. $0,2 \pm 0,1$ %, $p < 0,05$) nachgewiesen werden, wobei der prozentuale Anteil des Knochengewebes nach Gabe von Pantoprazol signifikant vermindert war ($88,6 \pm 5,1$ % vs. $99,3 \pm 0,3$ %, $p < 0,05$) (Abb. 31-33).

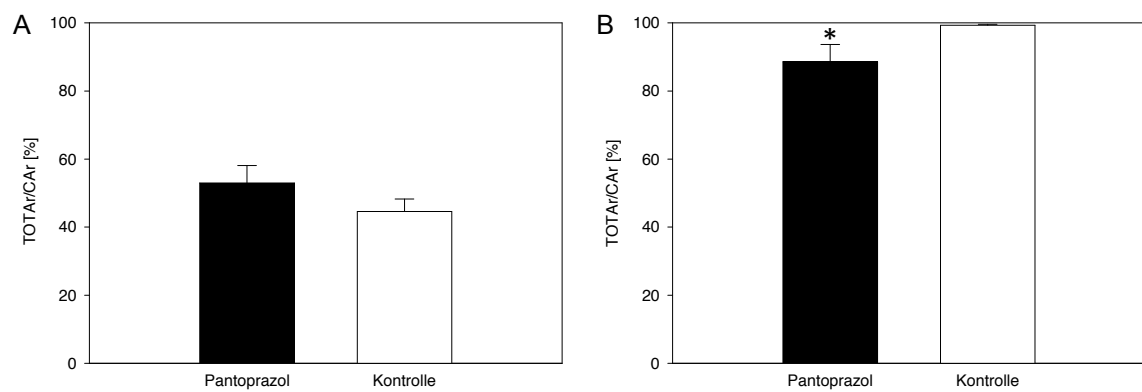


Abb. 31: Knochenanteil im periostalen Kallusgewebe. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

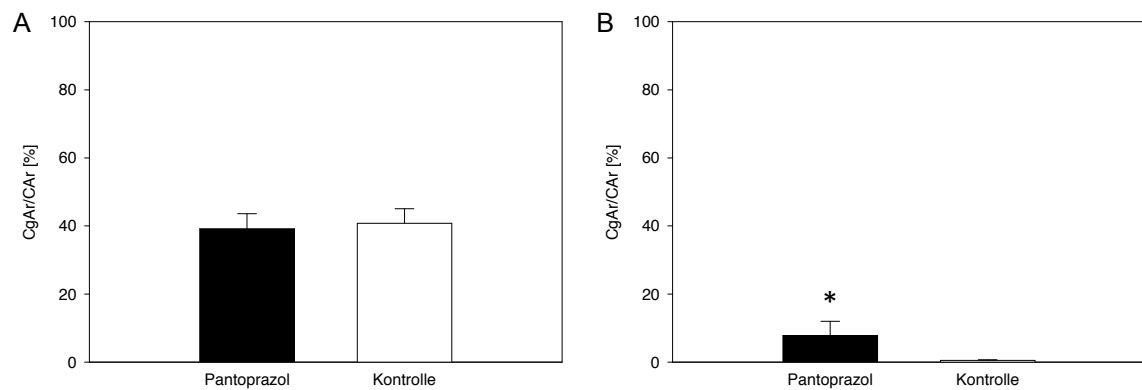


Abb. 32: Knorpelanteil im periostalen Kallusgewebe. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

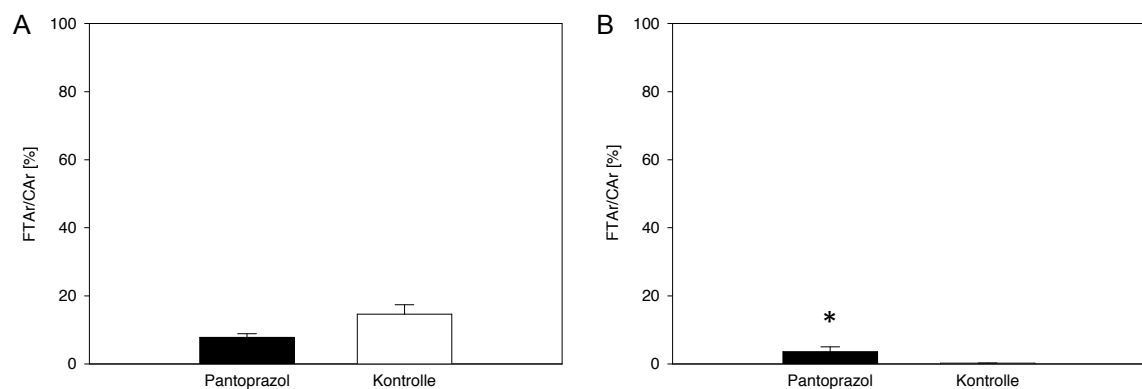


Abb. 33: Bindegewebeanteil im periostalen Kallusgewebe. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Ergebnisse der Gewebeanalyse spiegeln sich im Histo-Score wieder. Die mit Pantoprazol behandelten Tiere erreichten einen Score von $2,0 \pm 0,2$, die Kontrolltiere einen vergleichbaren Score von $2,5 \pm 0,3$ nach zweiwöchiger Frakturheilung ($p > 0,05$). Nach fünfwöchiger Heilung war der Frakturspalt in fast allen Proben der Kontrollgruppe vollständig überbrückt ($3,8 \pm 0,2$). Die Pantoprazol-Gruppe erreichte einen Score von $3,1 \pm 0,5$ ($p > 0,05$) (Abb. 34).

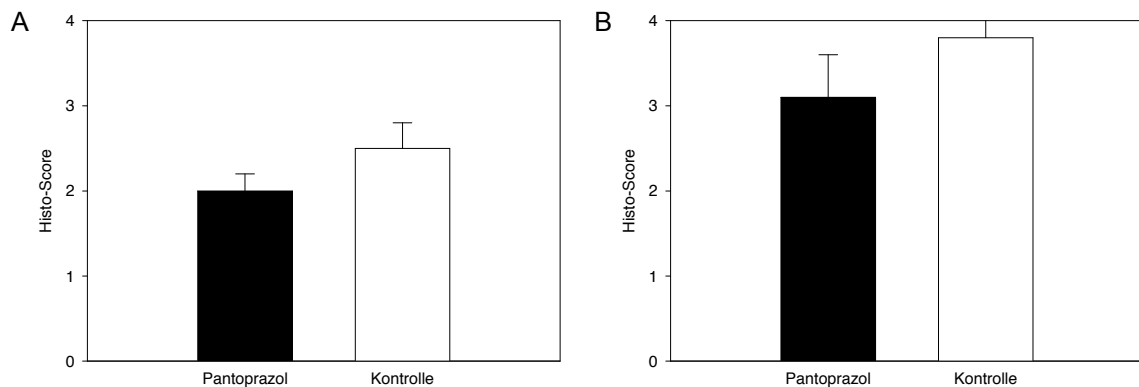


Abb. 34: Histoscore nach 2 (A) und 5 (B) Wochen Frakturheilung. Beide Kortices wurden bewertet: bindegewebige Überbrückung des Frakturspalts (0 Punkte), knorpelige Überbrückung (1 Punkt), knöcherne Überbrückung (2 Punkte). MW \pm SEM

Es bestand kein signifikanter Unterschied der TRAP-positiven Zellen pro HPF nach 2 Wochen zwischen der mit Pantoprazol behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe ($2,2 \pm 0,8$ Zellen/HPF vs. $1,3 \pm 0,2$ Zellen/HPF, $p > 0,05$). In der Kontrollgruppe waren die TRAP-positiven Zellen meist im knöchernen Anteil (95,1 %) lokalisiert, nur wenige im knorpeligen Anteil (4,9 %). Im Gegensatz dazu fand man bei den mit Pantoprazol behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt TRAP-positive Zellen im knorpeligen Anteil (22,9 %). Im knöchernen Anteil wurden 77,1 % der TRAP-positiven Zellen identifiziert. 5 Wochen postoperativ konnten in der Kontrollgruppe keine TRAP-positiven Zellen mehr nachgewiesen werden. In der Pantoprazol-Gruppe befanden sich alle im knöchernen Anteil ($0,1 \pm 0,0$ Zellen/HPF) (Abb. 35, 36).

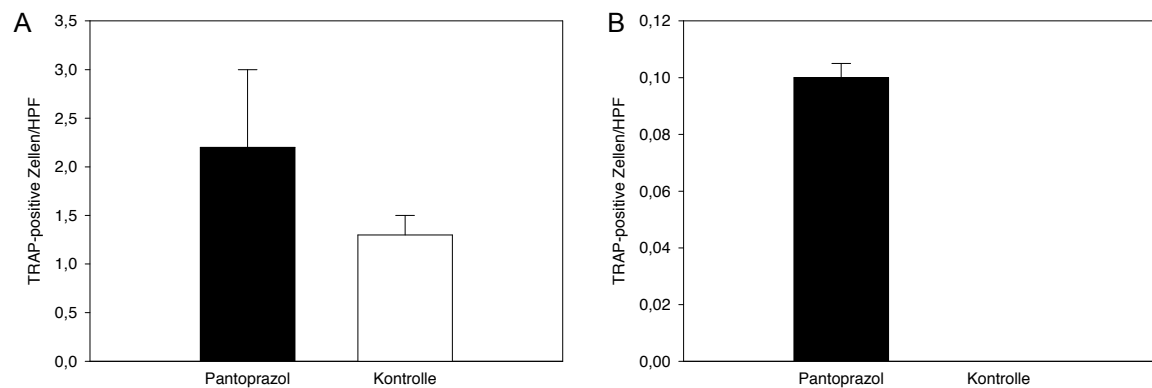


Abb. 35: TRAP-positive Zellen pro HPF. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ. MW ± SEM

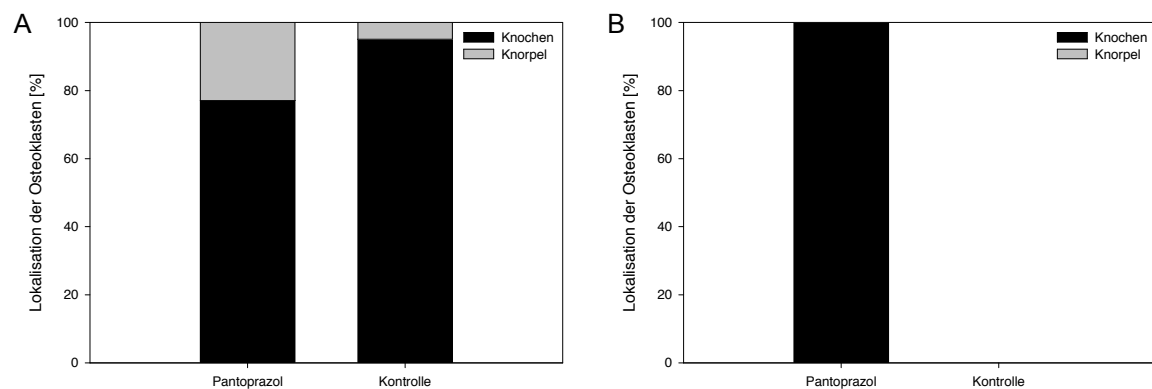


Abb. 36: Prozentuale Verteilung der TRAP-positiven Zellen im Knorpel- und Knochengewebe. (A) 2 Wochen postoperativ. (B) 5 Wochen postoperativ.

4.4 Western Blot

2 Wochen postoperativ erfolgte die Analyse der Proteinexpression im Kallusgewebe mittels Western Blot.

BMP-2 wurde in der Pantoprazolgruppe signifikant weniger im Vergleich zur Kontrollgruppe exprimiert ($2,0 \pm 0,1$ ODmm² vs. $4,0 \pm 1,0$ ODmm²) (Abb. 37). Ebenso war BMP-4 bei den mit Pantoprazol behandelten Tieren ($1,8 \pm 0,5$ ODmm²) signifikant geringer im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ($4,5 \pm 0,3$ ODmm², $p < 0,05$) (Abb. 38).

Auch die Expression von CYR 61 war nach Behandlung mit Pantoprazol verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich geringer ($4,6 \pm 1,4$ ODmm² vs. $8,7 \pm 4,0$ ODmm², $p = 0,056$) (Abb. 39).

Des Weiteren beeinflusst Pantoprazol signifikant die Osteoklastogenese. Dies zeigte sich entsprechend durch eine signifikant niedrigere Expression von RANKL ($6,5 \pm 1,0$ ODmm² vs. $9,8 \pm 2,1$ ODmm², $p < 0,05$) (Abb. 40). Der Inhibitor der Osteoklastogenese OPG war nach Behandlung mit Pantoprazol entsprechend erhöht ($8,1 \pm 4,0$ ODmm² vs. $6,0 \pm 2,2$ ODmm², $p > 0,05$) (Abb. 41). Folglich ist der RANKL/OPG Quotient nach Gabe von Pantoprazol erhöht.

Zusätzlich zeigte sich in der Pantoprazol-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression von PCNA ($8,3 \pm 5,3$ ODmm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($23,0 \pm 2,3$ ODmm², $p < 0,05$) (Abb. 42), entsprechend einer niedrigeren Zellproliferationsrate nach Gabe von Pantoprazol.

Die Western Blot Analysen zeigten, dass nach Gabe von Pantoprazol die Expression der Knochenformationsmarker deutlich vermindert war.

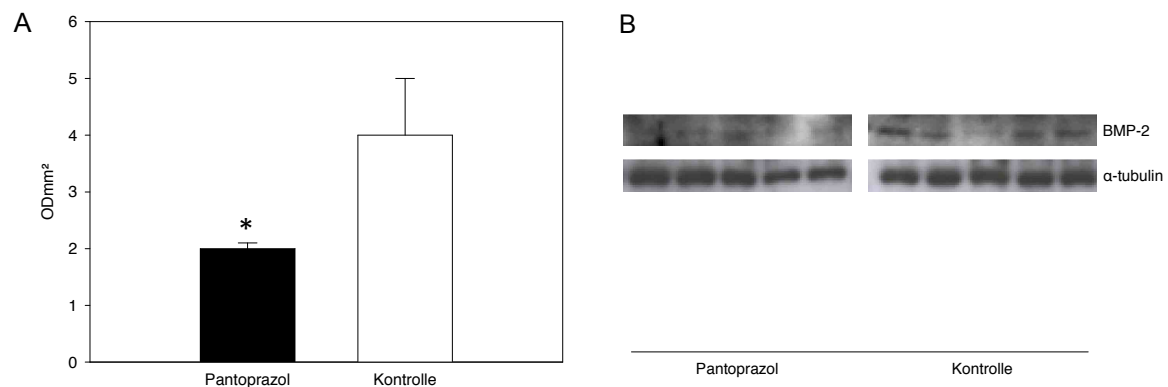


Abb. 37: Western Blot Analyse von BMP-2. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

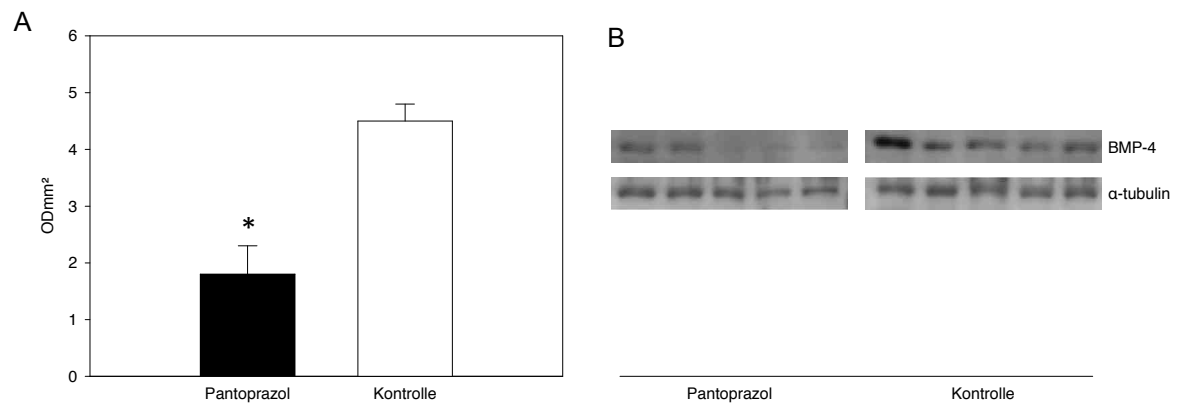


Abb. 38: Western Blot Analyse von BMP-4. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

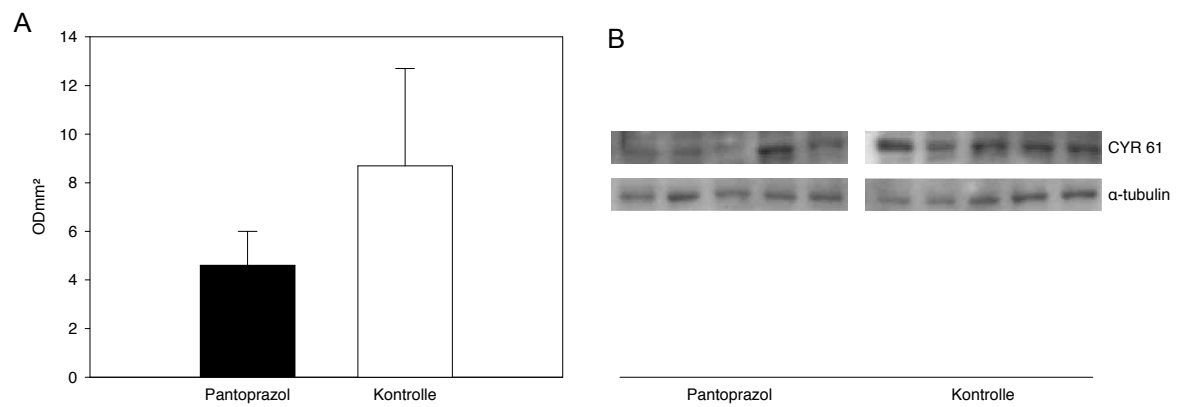


Abb. 39: Western Blot Analyse von CYR 61. MW \pm SEM

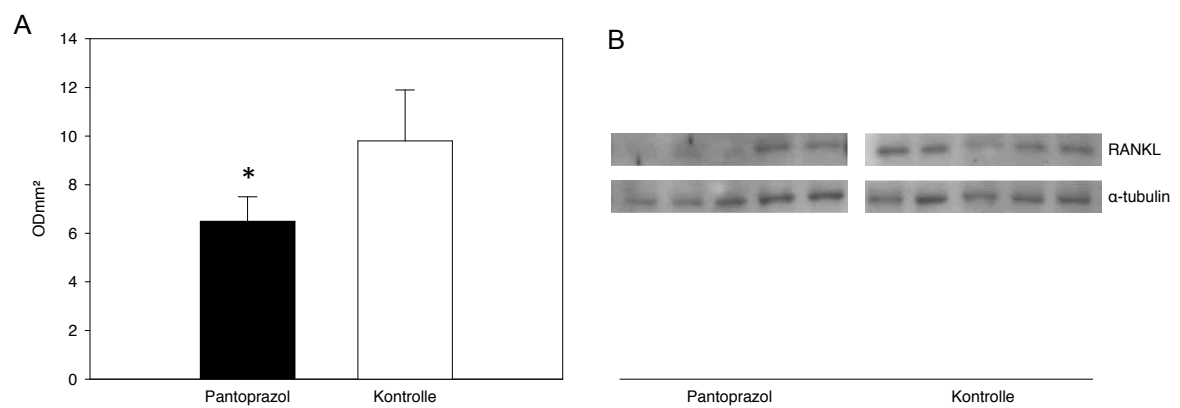


Abb. 40: Western Blot Analyse von RANKL. MW \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

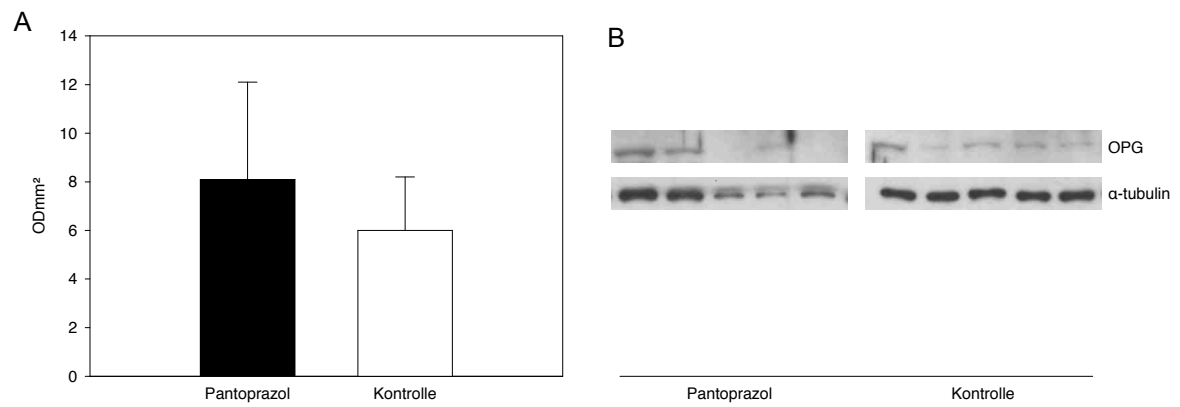


Abb. 41: Western Blot Analyse von OPG. MW ± SEM

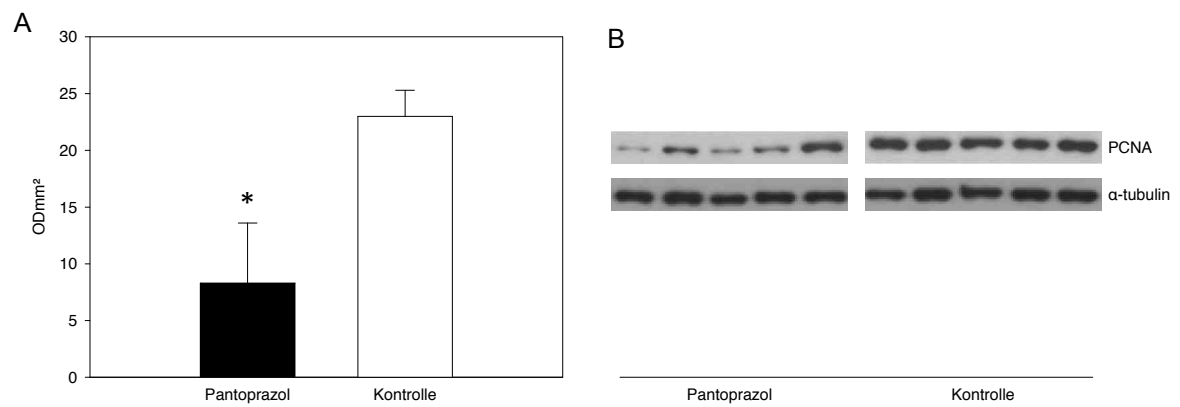


Abb. 42: Western Blot Analyse von PCNA. MW ± SEM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

5 Diskussion

Innerhalb dieser Studie sollte geklärt werden, ob die Behandlung von Mäusen mit Pantoprazol die Frakturheilung beeinflusst. Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass Pantoprazol durch Hemmung der Osteoklastenaktivität und der Knochenbildung den Remodelingprozess beeinträchtigt.

5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenbruchheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, dessen pathophysiologische Grundlagen nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungen sind. Der heutige Kenntnisstand über die Prozesse, die das Zusammenspiel von umliegenden Weichteilgewebe, Periost, des Gefäßsystems und des Immunsystems beeinflussen, haben ihren Ursprung in Versuchen mit Tiermodellen. Ein zuverlässiges Frakturmodell ist somit für die Untersuchung der Frakturheilung unumgänglich [45]. Das Mausmodell bietet hierfür optimale Bedingungen, da das Genom bereits vollständig bekannt ist und somit eine Vielzahl verschiedener “Tools”, wie zum Beispiel transgene Stämme und spezifische Antikörper vor allem für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung stehen [132]. Zudem sind die Anschaffungskosten und die Kosten der Tierhaltung sowie Zucht im Vergleich zu Großtiermodellen wesentlich günstiger. So ist es zum Beispiel möglich, größere Gruppengrößen zu untersuchen. Nachteilig ist jedoch, dass die Maus im Gegensatz zum Menschen kein Havers-System besitzt, weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Studien am Mausmodell auf den Menschen immer kritisch diskutiert

werden muss. Anstelle von Havers-Systemen werden für das Remodeling sogenannte Resorptionshöhlen verwendet, die in Frakturnähe entstehen und im weiteren Verlauf durch Osteoblasten aufgefüllt werden [118].

Bei Großtiermodellen hingegen ist die Anatomie, die Knochenstruktur als auch der histologische und zeitliche Ablauf der Frakturheilung mit dem Menschen vergleichbar. Jedoch gibt es im Gegensatz zu Mäusen keine genetisch definierte Stämme und entsprechende Antikörper zur Untersuchung molekularbiologischer Prozesse [47, 84]. Ein weiterer Nachteil von Großtiermodellen sind die höheren Anschaffungs- und Haltungskosten [118]. Wichtige Voraussetzungen für die tierexperimentelle Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Abläufen der Frakturheilung sind standardisierte Versuchsbedingungen. Die osteosynthetische Versorgung ist bei Großtiermodellen aufgrund der vergleichbaren Knochengröße wesentlich einfacher als bei der Maus.

Für die Maus existiert bereits eine große Anzahl verschiedener Frakturmodelle, die sich bezüglich der Frakturierung, der Frakturlokalisation und der Frakturfixierung unterscheiden [71]. In früheren Modellen wurde auch gänzlich auf eine Frakturstabilisierung verzichtet. Diese unfixierten Frakturmodelle erscheinen jedoch wenig sinnvoll, da ohne Kontrolle des “mechanical environment” keine eindeutige Aussage bezüglich Knochenheilung und Kallusbildung getroffen werden kann [32].

Am besten geeignet sind die großen Röhrenknochen der Maus wie die Tibia und das Femur [68, 100]. Das von Hiltunen et al. [68] publizierte Frakturmodell der Tibia ist wahrscheinlich das meist verwendete Frakturmodell. Der Nachteil dieses Modells besteht jedoch darin, dass die Tibia in ihrem Verlauf einen unregelmäßigen, dreieckigen Querschnitt aufweist und somit standardisierte biomechanische Testungen erschwert sind [28]. Bei einer geschlossenen Frakturierung der Tibia kann es zusätzlich zu einer Frakturierung der Fibula kommen und anschließend zu einer kombinierten Kallusbildung und letztendlich einer Synostose von Tibia und Fibula. Shefelbine et al. [147] konnte zudem zeigen, dass die Frakturheilung nach Osteotomie der Tibia bei intakter Fibula signifikant verbessert war. Zusätzlich bedingt die kaum vorhandene Muskel- und Weichteildeckung der Tibia und Fibula eine höhere Infektgefahr im Vergleich zu

Femurfrakturmodellen. Biomechanische Untersuchungen am Femur können aufgrund des gleichmäßigen runden Querschnitts standardisierter durchgeführt werden.

Das für diese Studie verwendete, geschlossene Femurfrakturmodell wurde bereits von Holstein et al. [79] 2009 publiziert und in mehreren vergangen Studien bereits mehrfach erfolgreich angewandt [73, 72, 75, 76]. Das Modell basiert auf dem Prinzip einer Zugschraube und erlaubt durch ein proximales Gewinde und einen distalen Konus eine zusätzliche Frakturspaltkompression. Dadurch gewährleistet die Fixierung nicht nur eine Rotationsstabilität, sondern auch eine axiale Stabilität und damit standardisierte Versuchsbedingungen [23, 79].

In früheren Modellen wurden mehrheitlich instabile Pin-Osteosynthesen verwendet, jedoch sind die Ergebnisse derartiger Studien durch die fehlende Rotationsstabilität nur begrenzt aussagekräftig, da die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt einen enormen Einfluss auf den Frakturheilungsprozess haben [32, 69]. Des Weiteren wurden in den bereits genannten Pin-Osteosynthese-Modellen die Frakturierung bei einliegendem Implantat durchgeführt, was zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Frakturheilung durch die Verbiegung des Implantates führen kann. In dieser Studie wurde deshalb die Schraube erst nach Frakturierung über einen zuvor eingebrachten Führungsdraht implantiert. Der Vorteil dieses Modells liegt in der guten Reproduzierbarkeit sowie in dem kleinen Zugangsweg. Mit Hilfe einer stumpfen Guillotine kann ein standardisierter transverser Frakturverlauf bei minimalen Weichteilschaden erzeugt werden.

Im Vergleich zu den geschlossenen Frakturmodellen stellen offene Frakturmodelle invasive Operationsverfahren dar, die mit einem größeren Weichteilschaden einhergehen, was letztendlich die Frakturheilung beeinträchtigen kann. Dabei wird das Femur über einen lateralen longitudinalen Schnitt präpariert und unter Sicht osteotomiert [28, 52, 74].

Prinzipiell gewährleisten offene Frakturmodelle wie der Fixateur externe [28] und die Plattenosteosynthese [70, 102] eine höhere Rotationsstabilität [69, 71]. Nachteil des Fixateur externe ist die externe Lage des Implants und das hohe Implantatgewicht, was zu einer Beeinflussung des physiologischen Bewegungsablaufs der Maus postoperativ

führen kann. Des Weiteren ist die Operation technisch sehr anspruchsvoll. Durch die externe Lage der Pins können zudem Infekte im Bereich der Eintrittsstellen entstehen [31]. Die stabile Versorgung mittels Plattenosteosynthese induziert im Gegensatz zu den bereits genannten Implantaten eine intramembranöse Heilung [74, 155] und bietet deshalb eine interessante Alternative vor allem zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der intramembranösen Frakturheilung [70].

Der Prozess der Knochenheilung wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Die Frakturheilung verläuft bei der Maus wesentlich schneller als beim Menschen [18], so dass nach zweiwöchiger Frakturheilung die maximale Kallusbildung erreicht wird [100]. Aufgrund dessen wurde zur Durchführung weiterer Untersuchungen, vor allem molekularbiologischer Untersuchungen des Kallusgewebes, dieser Zeitpunkt zur Beurteilung der frühen Phase der Frakturheilung gewählt. Manigrasso und O'Connor [100] konnten zeigen, dass 28 Tage postoperativ eine knöcherne Überbrückung des Frakturspalts nachweisbar war und nach circa 42 Tagen bereits der Remodeling-Prozess begonnen hatte, so dass 5 Wochen post operationem zur Beurteilung der späten Phase der Frakturheilung gewählt wurde. Die gewählten Zeitpunkte hatten sich in vorangegangenen Studien bereits bewährt [18, 67, 72, 73].

Es wurde eine Dosierung von 100 mg/kg KG Pantoprazol verwendet. Diese ist wesentlich höher als die üblichweise angewandte Dosierung von 0,3 bis 0,6 mg/kg KG. Bei kritischen Patienten mit säureassoziierten gastrointestinalen Krankheitsbildern kann die Dosis jedoch auf 4 mg/kg KG pro Tag erhöht werden [26]. Die Dosierung wurde in Anlehnung an andere tierexperimentelle Studien gewählt. So untersuchten Bilic et al. [12] bei Mäusen eine Dosierung von 1 mg/kg KG bis 100 mg/kg KG. Masubuchi et al. [101] wählte in einem Rattenmodell eine Dosierung von 5 mg/kg KG bis 300 mg/kg KG.

Die Operation konnte innerhalb 30 Minuten komplikationslos durchgeführt werden. Nach ein bis drei Tagen zeigten alle Tiere einen physiologischen Bewegungsablauf, so dass das Bein postoperativ adäquat belastet werden konnte. Während des postoperativen Verlaufs bis zur Tötung der Tiere zeigten sich keine Wundheilungsstörungen, Infektionen oder Verhaltensauffälligkeiten.

Zur Beurteilung der Frakturheilung wurden biomechanische, radiologische, histologische sowie proteinbiochemische Verfahren zu definierten Zeitpunkten gewählt. Die Biegesteifigkeit des Knochens wurde mittels zerstörungsfreier 3-Punkt-Biegung bestimmt. Die zerstörungsfreie biomechanische Testung mittels 3-Punkt-Biegung stellt ein etabliertes Verfahren dar [69], welches erlaubt, die Biegesteifigkeit anhand des Kraft-Weg-Diagramms zu ermitteln. Ein entscheidender Vorteil dieser Testung ist, dass die Knochen anschließend zur weiteren histologischen Auswertung aufgearbeitet werden können und so die benötigte Tierzahl für Studien reduziert werden kann.

Bei der 4-Punkt-Biegung wird die Kraft auf eine größere Fläche verteilt, was biomechanisch im Vergleich zur 3-Punkt-Biegung günstiger ist [21]. Bei einer Femurlänge von nur 17 mm wurde jedoch auf die Verwendung einer 4-Punkt-Biege-Testung verzichtet. Ein weiteres Verfahren zur biomechanischen Testung ist die Rotationstestung. Vorteil dieses Testverfahrens ist sicherlich, dass ähnlich wie beim Menschen der Frakturmechanismus im Sinne einer Rotationskomponente nachgeahmt werden kann. Ein entscheidender Nachteil dieses Verfahrens ist aber, dass die Untersuchung nicht zerstörungsfrei durchgeführt werden kann und die benötigte Tierzahl quasi verdoppelt werden müsste.

Die von Gerstenfeld et al. [55] publizierte Methode zur Beurteilung der Knochenheilung ist das wohl am häufigsten angewandte Verfahren zur histomorphometrischen Quantifizierung der Knochenheilung. Ergänzend wurden beide Kortices in Höhe des Frakturspaltens bezüglich der Gewebeart mit einem Punktesystem zur Bestimmung der Kallusqualität bewertet [53]. Die Bestimmung erfolgte anhand von sagittalen, longitudinalen Schnitten in Höhe des maximalen Femurdurchmessers um eine reproduzierbare Darstellung des Kallusdurchmessers, der Kallusfläche und der Gewebetypen zu erreichen. Die dreidimensionale Struktur des Kallus erschwerte hierbei die standardisierte Analyse. Der Knochen wurde zur histologischen Aufarbeitung zuerst dekalzifiziert, so dass die Möglichkeit für zusätzliche immunhistochemische Färbungen gegeben war. Nachteil ist, dass nach erfolgter Dekalzifizierung der Kalksalzgehalt des Knochens nicht mehr beurteilt werden kann.

Die proteinbiochemische Analyse wurde ausschließlich nach zweiwöchiger Frakturheilung durchgeführt, da 5 Wochen postoperativ entsprechend dem bereits begonnenen Remodeling-Prozess nicht mehr genügend Kallusgewebe gewonnen werden konnte [78].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Wir konnten erstmalig zeigen, dass Pantoprazol die späte Phase der Frakturheilung im Mausmodell beeinträchtigt. 5 Wochen postoperativ zeigte sich nach Behandlung mit Pantoprazol eine signifikant verminderte Biegesteifigkeit und Knochenbildung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Wahrscheinlich beeinträchtigt die Hemmung der Osteoklastenaktivität bei verminderter RANKL-Expression den Remodelingprozess des Frakturkallus. Zudem war die Zellproliferation und Knochenbildung bei verminderten Expressionen von PCNA, BMP-2, BMP-4 und CYR 61 nach Gabe von Pantoprazol geringer.

Zahlreiche klinische Studien konnten bisher nachweisen, dass die Einnahme von Pantoprazol zu einem erhöhten Frakturrisiko führt. Targownik et al. [160] verglichen insgesamt 15792 Osteoporose induzierte Frakturen mit 47289 Frakturen anderer Genese. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass nach mindestens siebenjähriger Einnahme von PPIs das Risiko für eine Osteoporose induzierte Fraktur signifikant erhöht war. Für eine hüftnahe Fraktur war das Risiko bereits nach fünfjähriger Einnahme deutlich erhöht. Eine andere Arbeitsgruppe analysierte 13556 hüftnahe Frakturen der Jahre 1987 bis 2003 in Großbritannien von Patienten mit einer PPI Medikation, die mindestens 50 Jahre alt waren und verglichen diese mit 135386 Patienten, die keine PPIs einnahmen [178]. Die Studie zeigte, dass die Einnahme von PPIs über ein Jahr bereits das Risiko für hüftnahe Frakturen signifikant erhöht. Ähnliche Ergebnisse konnten Yu et al. [180] nachweisen, die 5755 Männer und 5339 Frauen aus der “Osteoporotic Fracture Men Study (MrOS)” und “Study of Osteoporotic Fractures (SOF)” analysierten. Es konnte gezeigt werden, dass Männer, die PPIs und/oder H2-Rezeptor Antagonisten einnahmen, eine verminderte Knochendichte besaßen. Bei Frauen war die Knochendichte nicht

signifikant verändert, aber das Risiko nicht-spinaler Frakturen nach Einnahme von PPIs erhöht.

Eine weitere Studie von Targownik et al. [161] untersuchte Patienten mit Osteoporose im Bereich der Hüfte oder Wirbelsäule ($T\text{-score} \leq -2,5$) mit entsprechenden Kontrollen ($T\text{-score} \geq -1,0$). Im Gegensatz zu den vorherigen Studien, konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der Einnahme von mehr als 1500 DDD PPIs innerhalb der letzten 5 Jahre und dem Auftreten von Osteoporose beziehungsweise einer verminderten Knochendichte nachgewiesen werden. Auch in unserer Studie konnte kein negativer Einfluss hinsichtlich der Knochenqualität nach PPI-Gabe auf den gesunden Femur nachgewiesen werden.

Ein weiterer Grund für eine reduzierte Knochendichte und damit erhöhtes Frakturrisiko nach Einnahme von PPIs könnte der verminderte Vitamin B₁₂-Spiegel sein. So konnten zum Beispiel Valuck und Ruscini [172] in einer Fall-Kontroll-Studie zeigen, dass ein erniedrigter Vitamin B₁₂-Spiegel durch die Einnahme von PPIs verursacht sein kann. Mit der Framingham Offspring Osteoporose Studie, bei der insgesamt 2576 Patienten teilnahmen, konnte letztendlich ein Zusammenhang zwischen einem verminderten Vitamin B₁₂-Spiegel und einer reduzierten Knochendichte nachgewiesen werden [166]. Möglicherweise führt die Einnahme von PPIs nicht nur zu einem verminderten Vitamin B₁₂-Spiegel, sondern auch zu einer negativen Kalziumbilanz, was zu einer verminderten Knochendichte führt und damit das Frakturrisiko erhöht [62, 121].

Der Hauptfokus aktueller Studien liegt jedoch darin, den Einfluss von PPIs auf die Funktion der Osteoklasten zu untersuchen. PPIs inhibieren die E₁-E₂-Typ H⁺/K⁺-ATPase der Belegzellen und hemmen dadurch die Magensäuresekretion [97, 108]. In Osteoklasten erfolgt der Protonentransport über die vakuoläre H⁺-ATPase [11, 14, 170]. Obwohl die H⁺/K⁺-ATPase in Osteoklasten nicht beschrieben ist und sich die Struktur der Protonenpumpen unterscheidet, konnten einige Studien zeigen, dass die Gabe von PPIs die Knochenresorption hemmen [4, 167].

So konnten zum Beispiel Tuukkanen und Väänänen [167] in einer in vitro Studie

demonstrieren, dass die Gabe von Omeprazol die Kalziumfreisetzung signifikant vermindert. Dazu wurde den Versuchstieren radioaktiv markiertes Kalzium über einen Zeitraum von vier Tagen verabreicht. Nach Tötung der Tiere und Entnahme der Kalotte wurde die Knochenresorption nach Stimulierung durch Prostaglandin E₂ und Parathormon gemessen. Die Proben, die zusätzlich mit Omeprazol für 24 bis 48 Stunden inkubiert wurden, zeigten eine entsprechend niedrigere Kalziumfreisetzung und Knochenresorption.

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls die knochenresorptionshemmende Wirkung von PPIs *in vivo*. Die histologischen Untersuchungen konnten zeigen, dass die Behandlung mit Omeprazol respektive Pantoprazol die Resorption des eingebrachten Kalziumphosphat-Zements hemmt. Die Autoren postulieren daher, dass der Effekt auf eine Hemmung der H⁺-ATPase der Osteoklasten zurückzuführen ist [148].

Visentin et al. [173] untersuchten den Einfluss eines potenten und selektiven Inhibitors, SB 242784, der vakuolären H⁺-ATPase der Osteoklasten im Tiermodell. Sie konnten zeigen, dass die orale Gabe von SB 242784 über 6 Monate in ovariectomierten Ratten die Knochenresorption vermindert. Dazu wurde die Knochendichte nach Gabe von SB 242784 im Vergleich zur Behandlung mit Östrogen bestimmt. Beide Behandlungen verhinderten effektiv den fortschreitenden Knochenverlust nach Ovariectomie. Zudem wurde der Knochenresorptionsmarker Desoxypyridinolin im Urin bestimmt. Die zunächst erhöhten Messwerte nach Ovariectomie wurden durch die Behandlung sowohl mit Östrogen als auch mit SB 242784 signifikant gesenkt. Unsere Untersuchungen konnten ebenfalls eine signifikante Reduktion des Knochenresorptionsmarkers RANKL nachweisen, so dass wahrscheinlich auch die Gabe von Pantoprazol als nicht-selektiver Hemmer der H⁺-ATPase der Osteoklasten in der Lage ist, die Knochenresorption im Rahmen des Remodelingprozesses zu hemmen. Die Hemmung des Remodelingprozesses durch die Behandlung mit Pantoprazol bestätigte sich auch in unseren histologischen und biomechanischen Ergebnissen. So konnte nachgewiesen werden, dass der Knochenanteil in der späten Phase der Frakturheilung signifikant geringer war bei einem höheren Anteil an Knorpelgewebe, was letztendlich zu einer geringeren Biegesteifigkeit

führte.

Im Gegensatz dazu konnten Gerstenfeld et al. [56] zeigen, dass die Inhibition von RANKL durch die Gabe von Denosumab in einem Frakturmodell der Maus die biomechanischen Eigenschaften des Knochens verbessert. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass die Behandlung mit Pantoprazol nicht nur das RANKL/RANK/OPG-System beeinflusst, sondern auch Einfluss auf die Expression verschiedener osteogener Marker hat. So konnten wir in der hier vorliegenden Studie zeigen, dass die Expression von BMP-2, BMP-4 und CYR 61 deutlich vermindert war.

Interessanterweise unterscheidet sich die Anzahl der Osteoklasten im Kallus in unserer Untersuchung trotz verminderter Expression von RANKL nicht. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen fanden Hyun et al. [82], dass die Behandlung mit Omeprazol keinen Einfluss auf die Anzahl der TRAP-positiven Zellen hat. Dazu untersuchten sie in vitro murine Zellen, die mit einer steigenden Dosis Omeprazol behandelt wurden. Die Western Blot Untersuchungen zeigten ebenfalls eine verminderte RANKL-Expression sowie eine erhöhte Expression von OPG, so dass das Verhältnis von OPG/RANKL vergleichbar mit unseren Ergebnissen zu Gunsten von OPG verändert war.

Ähnliche Ergebnisse konnten bisher nicht nur in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden, sondern auch beim Menschen. Mizunashi et al. [105] untersuchten das Ausmaß der Knochenresorption bei Patienten, die in der Vorgeschichte an Magengeschwüren litten und mit PPIs behandelt wurden, verglichen mit einer Gruppe, die keine PPIs erhielten. Die Arbeitsgruppe fand analog zu unseren Resultaten geringere Knochenresorptionsmarker in der PPI-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Autoren postulierten daher, dass die Behandlung mit PPIs erfolgreich bei verschiedenen metabolischen Krankheiten, die mit einer erhöhten Knochenresorption einhergehen, therapeutisch eingesetzt werden kann.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Ergebnissen konnten andere Autoren keinen Nachweis finden, dass die Inhibition der gastralen Protonenpumpe zu einer Hemmung der Knochenresorption führt. So untersuchten zum Beispiel Fossmark et al. [50], in

einem gastralen H^+/K^+ -ATPase Knockout-Modell der Maus den Einfluss auf den Knochenmetabolismus. Bestimmt wurden die Knochendichte, die Kortikalisdicke, das Trabekelvolumen und die maximale Versagenslast des Femurs im Alter von 6 und 20 Monaten. Interessanterweise war in beiden Altersgruppen die Knochendichte in den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert. Zudem war die Versagenslast und die Kortikalisdicke bei den älteren Knockout Tieren geringer, was letztendlich gegen eine Hemmung der Protonenpumpe der Osteoklasten spricht im Sinne einer verminderten Knochenresorption. Jedoch war wie in unserer Arbeit das Verhältnis von OPG/RANKL in den Knockout-Mäusen erhöht.

Auch Cui et al. [35] konnten zeigen, dass die Behandlung mit Omeprazol im Gegensatz zu unseren Ergebnissen die Knochenresorption nicht hemmt. Dies spiegelt sich in einer verminderten Knochendichte bei Ratten wider, die über 77 Tage täglich mit Omeprazol behandelt wurden.

Unsere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die Behandlung mit Pantoprazol nicht nur Auswirkungen auf das RANKL/RANK/OPG System hat, sondern auch die Expression verschiedener osteogener Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP-2 und BMP-4 beeinflusst. Während der Frakturheilung spielen die von Urist [168] 1965 entdeckten BMPs eine entscheidende Schlüsselrolle. Sobald mesenchymale Vorläuferzellen in das Frakturhämatom einwandern, beginnen diese BMP-2 und BMP-4 zu produzieren [17]. Im weiteren Heilungsverlauf wird BMP-2 und BMP-4 auch durch unreife Knorpelzellen gebildet [17]. Diese osteogene Phase ist durch die Expression der Knochenformationsmarker, die innerhalb von 24 Stunden nach Frakturentstehung gebildet werden, bestimmt. Die maximale Expression wird zwischen dem 14. und 20. Tag während der Kallusmineralisierung erreicht. Die signifikant verminderte Expression von BMP-2 und BMP-4 zwei Wochen postoperativ könnte somit ursächlich für die verminderte Kallusqualität nach Gabe von Pantoprazol sein.

Auch Tsuji et al. [165] konnten zeigen, dass Mäuse, die kein BMP-2 produzieren, Spontanfrakturen im Bereich der Extremitäten erleiden, die letztendlich nicht suffizient heilen. Die Frakturheilung war bereits in einer frühen Phase deutlich beeinträchtigt,

so dass die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass BMP-2 für die Frakturheilung eine unabdingbare Voraussetzung ist.

So untersuchten Devlin et al. [40] den Einfluss von Noggin, einem Glycoprotein, dass selektiv BMPs bindet und somit die Signalübertragung der BMPs blockiert. Der Arbeitsgruppe gelang es mit Hilfe histologischer Untersuchungen zu zeigen, dass in Mäusen, die Noggin überexprimierten, das Knochenvolumen, die Trabekelanzahl und die Knochenformationsrate vermindert war. Des Weiteren führte die vermehrte Expression von Noggin zu einer reduzierten Expression weiterer Knochenformationsmarker sowie RANKL. In unserer Studie war in der Pantoprazol-Gruppe die Expression von BMP-2, BMP-4 und RANKL ebenfalls vermindert. Beides führte letztendlich zu einer Beeinträchtigung des Remodelingprozesses.

Zusätzlich untersuchten wir in unserer Studie auch die Expression von CYR 61, ein weiterer essentieller Wachstumsfaktor der Osteoblastenfunktion. So konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte CYR 61 Expression ebenfalls zu einer gesteigerten Zellproliferation und Osteoblastendifferenzierung führt. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten, dass Pantoprazol die Expression von CYR 61 deutlich vermindert. Hadjiargyrou et al. [63] untersuchten zum Beispiel die Expression von CYR 61 während des Frakturheilungsprozesses im Rattenmodell. Die Autoren konnten nachweisen, dass CYR 61 bereits in der frühen Phase der Frakturheilung zwischen dem 3. und 5. Tag exprimiert wird. Der höchste Anstieg konnte zwischen dem 7. und 10. Tag verzeichnet werden. Dies korrelierte mit der Phase der Chondrogenese. Zudem fand die Arbeitsgruppe eine 10-fach höhere Konzentration von CYR 61 während der Frakturheilung im Vergleich zu einem nicht frakturierten Knochen.

Die Arbeitsgruppen von Si et al. [152] und Schütze et al. [146] demonstrierten, dass CYR 61 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Suppression von CYR 61 in Stammzellen die Differenzierung von Osteoblasten über den Wnt3A-Signalweg maßgeblich beeinträchtigt [152]. Crockett et al. [34] konnten jedoch zeigen, dass CYR 61 auch eine hemmende Wirkung auf Osteoklasten ausübt. Eine Regulation über das RANKL/RANK/OPG-System

konnte nicht belegt werden. Die Western Blot Ergebnisse unserer Arbeit zeigten für beide Marker eine erniedrigte Expression.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Pantoprazol die Knochenheilung verzögert. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass sowohl der Knochenaufbau als auch der Knochenabbau im Rahmen des Remodeling-Prozesses durch die Behandlung mit Pantoprazol beeinträchtigt wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Allen HL, Wase A, Bear WT (1980) Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 51:595–600
2. An Y, Friedman RJ, Parent T, Draughn RA (1994) Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* 8:111–115
3. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175–179
4. Anderson RE, Woodbury DM, Jee WS (1986) Humoral and ionic regulation of osteoclast acidity. *Calcif Tissue Int* 39:252–258
5. Andersson T (1996) Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole. *Clin Pharmacokinet* 31:9–28
6. Andersson T, Holmberg J, Röhss K, Walan A (1998) Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br J Clin Pharmacol* 45:369–375
7. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY (1990) Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res* 8:238–246

8. Arroyo M, Lanas A (2006) NSAIDs-induced gastrointestinal damage. Review. *Minerva Gastroenterol Dietol* 52:249–259
9. Ashhurst DE, Hogg J, Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury* 14:236–242
10. Bassett CA, Valdes MG, Hernandez E (1982) Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am* 64:888–895
11. Bekker PJ, Gay CV (1990) Biochemical characterization of an electrogenic vacuolar proton pump in purified chicken osteoclast plasma membrane vesicles. *J Bone Miner Res* 5:569–579
12. Bilic I, Zoricic I, Anic T, Separovic J, Stancic-Rokotov D, Mikus D, Buljat G, Ivankovic D, Aralica G, Prkacin I, Perovic D, Mise S, Rotkvic I, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Sikiric P (2001) Haloperidol-stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC 157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. *Life Sci* 68:1905–1912
13. Black J, Balligand M, Nunamaker DM, Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc* 10:29
14. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245:855–857
15. Bliesath H, Huber R, Hartmann M, Lühmann R, Wurst W (1994) Dose linearity of the pharmacokinetics of the new H⁺/K⁽⁺⁾-ATPase inhibitor pantoprazole after single intravenous administration. *Int J Clin Pharmacol Ther* 32:44–50
16. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101

17. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13:357–367
18. Bourque WT, Gross M, Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42:369–374
19. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–342
20. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ, Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3:331–340
21. Burstein AH, Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4:155–158
22. Calvet X, Ducons J, Bujanda L, Bory F, Montserrat A, Gisbert JP, Hp Study Group of the Asociación Española de Gastroenterología (2005) Seven versus ten days of rabeprazole triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a multicenter randomized trial. *Am J Gastroenterol* 100:1696–1701
23. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S41–S55
24. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG, Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* 241:24–35
25. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM 3rd, Hayes WC, Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9:131–142
26. Cheer SM, Prakash A, Faulds D, Lamb HM (2003) Pantoprazole: an update of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acid-related disorders. *Drugs* 63:101–133

27. Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60:283–290
28. Cheung KMC, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah KSE (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21:685–690
29. Chey WD, Wong BCY, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology (2007) American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 102:1808–1825
30. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17:513–520
31. Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24:1178–1185
32. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ, Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S132–S147
33. Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16:521–527
34. Crockett JC, Schütze N, Tosh D, Jatzke S, Duthie A, Jakob F, Rogers MJ (2007) The matricellular protein CYR61 inhibits osteoclastogenesis by a mechanism independent of α v β 3 and α v β 5. *Endocrinology* 148:5761–5768
35. Cui GL, Syversen U, Zhao CM, Chen D, Waldum HL (2001) Long-term omeprazole treatment suppresses body weight gain and bone mineralization in young male rats. *Scand J Gastroenterol* 36:1011–1015

36. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl* 134:1–78
37. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D, Shoeneker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res* 180:291–300
38. Davy DT, Connolly JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech* 15:235–247
39. Deibert MC, Mcleod BR, Smith SD, Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular osteotomy. *J Orthop Res* 12:878–885
40. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E (2003) Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144:1972–1978
41. Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J (1984) Effects on fracture healing of an antagonist of the vitamin K cycle. *Calcif Tissue Int* 36:233–238
42. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W, Augat P, Schieker M (2008) Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 14:79–88
43. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT, Chao EY (1993) Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma* 34:185–192
44. Einhorn T (1991) Mechanisms of fracture healing. *Hosp Pract (Off Ed)* 26 Suppl 1:41–45
45. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S7–S21

46. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM (2003) A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A:1425–1435
47. Elmstedt E (1981) Skeletal complications in the renal transplant recipient. A clinical study. *Acta Orthop Scand Suppl* 190:1–44
48. Fitton A, Wiseman L (1996) Pantoprazole. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in acid-related disorders. *Drugs* 51:460–482
49. Ford A, Moayyedi P (2003) How can the current strategies for *Helicobacter pylori* eradication therapy be improved? *Can J Gastroenterol* 17 Suppl B:36B–40B
50. Fossmark R, Stunes AK, Petzold C, Waldum HL, Rubert M, Lian AM, Reseland JE, Syversen U (2012) Decreased bone mineral density and reduced bone quality in H(+) /K(+) ATPase beta-subunit deficient mice. *J Cell Biochem* 113:141–147
51. Fujioka T, Yoshiiwa A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K (2007) Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: current status and future prospects. *J Gastroenterol* 42 Suppl 17:3–6
52. Garcia P, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Culemann U, Pizanis A, Wirbel RJ, Pohlemann T, Menger MD (2008) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech* 41:1689–1696
53. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84–91
54. Georgiadis GM, Minster GJ, Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma* 4:323–330

55. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715–1722
56. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, Ominsky MS, Kostenuik PJ, Morgan EF, Einhorn TA (2009) Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 24:196–208
57. Giannoudis PV, Ahmad MA, Mineo GV, Tosounidis TI, Calori GM, Kanakaris NK (2013) Subtrochanteric fracture non-unions with implant failure managed with the "Diamond" concept. *Injury* 44 Suppl 1:S76–S81
58. Gisbert JP, Pajares JM (2005) Systematic review and meta-analysis: is 1-week proton pump inhibitor-based triple therapy sufficient to heal peptic ulcer? *Aliment Pharmacol Ther* 21:795–804
59. Glatzel D, Abdel-Qader M, Gatz G, Pfaffenberger B (2007) Pantoprazole 40 mg is as effective as esomeprazole 40 mg to relieve symptoms of gastroesophageal reflux disease after 4 weeks of treatment and superior regarding the prevention of symptomatic relapse. *Digestion* 75 Suppl 1:69–78
60. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389–404
61. Gralnek IM, Dulai GS, Fennerty MB, Spiegel BMR (2006) Esomeprazole versus other proton pump inhibitors in erosive esophagitis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:1452–1458
62. Graziani G, Badalamenti S, Como G, Gallieni M, Finazzi S, Angelini C, Brancaccio D, Ponticelli C (2002) Calcium and phosphate plasma levels in dialysis patients after dietary Ca-P overload. Role of gastric acid secretion. *Nephron* 91:474–479

63. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014–1023
64. Hartmann M, Theiss U, Huber R, Lühmann R, Bliesath H, Wurst W, Lücker PW (1996) Twenty-four-hour intragastric pH profiles and pharmacokinetics following single and repeated oral administration of the proton pump inhibitor pantoprazole in comparison to omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 10:359–366
65. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT (1991) The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 73:750–764
66. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26:681–686
67. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E (1993) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* 297:23–27
68. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11:305–312
69. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T (2009) Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res* 27:1152–1156
70. Histing T, Garcia P, Matthys R, Leidinger M, Holstein JH, Kristen A, Pohlemann T, Menger MD (2010) An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res* 28:397–402
71. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49:591–599

72. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2011) Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 29:867–873
73. Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger MD (2012) Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res* 173:83–90
74. Histing T, Klein M, Stieger A, Stenger D, Steck R, Matthys R, Holstein JH, Garcia P, Pohlemann T, Menger MD (2012) A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res* 178:715–721
75. Histing T, Stenger D, Kuntz S, Scheuer C, Tami A, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Increased Osteoblast and Osteoclast Activity in Female Senescence-Accelerated, Osteoporotic SAMP6 Mice During Fracture Healing. *J Surg Res* 175:271–277
76. Histing T, Kuntz S, Stenger D, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2013) Delayed fracture healing in aged senescence-accelerated p6 mice. *J Invest Surg* 26:30–35
77. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40:215–219
78. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80:893–900
79. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71–75
80. Huber R, Kohl B, Sachs G, Senn-Bilfinger J, Simon WA, Sturm E (1995) Review

- article: the continuing development of proton pump inhibitors with particular reference to pantoprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 9:363–378
81. Huber R, Hartmann M, Bliesath H, Lühmann R, Steinijans VW, Zech K (1996) Pharmacokinetics of pantoprazole in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:S7–S16
82. Hyun JJ, Chun HJ, Keum B, Seo YS, Kim YS, Jeon YT, Lee HS, Um SH, Kim CD, Ryu HS, Kim SG, Jung WW (2010) Effect of omeprazole on the expression of transcription factors in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Mol Med* 26:877–883
83. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun* 262:443–451
84. Jacenko O, Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43:39–41
85. Jensen RT (2006) Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:4–19
86. Johnson AL, Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49:101–105
87. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL, White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3:325–330
88. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ (2007) An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52:383–390
89. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* 318:222–230

90. Kliem V, Bahlmann J, Hartmann M, Huber R, Lühmann R, Wurst W (1998) Pharmacokinetics of pantoprazole in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 13:1189–1193
91. Kromer W (1995) Similarities and differences in the properties of substituted benzimidazoles: a comparison between pantoprazole and related compounds. *Digestion* 56:443–454
92. Lanas A, Scheiman J (2007) Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. *Curr Med Res Opin* 23:163–173
93. Lane WA (1909) The Operative Treatment of Fractures. *Ann Surg* 50:1106–1113
94. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE Jr (1985) Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 3:499–507
95. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA, Kelly PJ (1984) Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am* 66:1084–1091
96. Lewis SJ, Franco S, Young G, O’Keefe SJ (1996) Altered bowel function and duodenal bacterial overgrowth in patients treated with omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 10:557–561
97. Lindberg P, Nordberg P, Alminger T, Brändström A, Wallmark B (1986) The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor omeprazole. *J Med Chem* 29:1327–1329
98. Lippert H (2003) *Lehrbuch Anatomie*. Urban & Fischer
99. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56:772–781

100. Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687–695
101. Masubuchi N, Hakusui H, Okazaki O (1997) Effects of pantoprazole on xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver microsomes: a comparison with other proton pump inhibitors. *Drug Metab Dispos* 25:584–589
102. Matthys R, Perren SM (2009) Internal fixator for use in the mouse. *Injury* 40 Suppl 4:S103–S109
103. Mégraud F (2005) Update on Therapeutic Options for *Helicobacter pylori*-related Diseases. *Curr Infect Dis Rep* 7:115–120
104. Meyer UA (1996) Interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450: consequences for drug interactions. *Yale J Biol Med* 69:203–209
105. Mizunashi K, Furukawa Y, Katano K, Abe K (1993) Effect of omeprazole, an inhibitor of H⁺,K(+) -ATPase, on bone resorption in humans. *Calcif Tissue Int* 53:21–25
106. Moayyedi P, Talley NJ (2006) Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 367:2086–2100
107. Morgner A, Miehle S, Labenz J (2007) Esomeprazole: prevention and treatment of NSAID-induced symptoms and ulcers. *Expert Opin Pharmacother* 8:975–988
108. Morii M, Takata H, Takeguchi N (1990) Binding site of omeprazole in hog gastric H(+),K(+)-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 167:754–760
109. Mössner J (2010) Magen-Darm-Mittel und Laxantien. In: Schwabe U, Paffrath D (eds) *Arzneiverordnungs-Report 2010: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 681–709
110. Mössner J (2011) Magen-Darm-Mittel und Laxantien. In: Schwabe U, Paffrath D (eds) *Arzneiverordnungs-Report 2011: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 699–728

111. Mössner J (2012) Magen-Darm-Mittel und Laxantien. In: Schwabe U, Paffrath D (eds) Arzneiverordnungs-Report 2012: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 713–743
112. Müller J, Schenk R, Willenegger H (1968) Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius. *Helv Chir Acta* 35:301–308
113. Müller ME, Nazarian S, Koch P (1987) AO-Klassifikation der Frakturen. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
114. Naesdal J, Brown K (2006) NSAID-associated adverse effects and acid control aids to prevent them: a review of current treatment options. *Drug Saf* 29:119–132
115. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9:651–659
116. Neal KR, Scott HM, Slack RC, Logan RF (1996) Omeprazole as a risk factor for campylobacter gastroenteritis: case-control study. *BMJ* 312:414–415
117. Newton CD, Nunamaker DM (1985) Textbook of Small Animal Orthopaedics. J.B. Lippincott Company, Philadelphia
118. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl:S56–S65
119. Nunamaker DM, Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 138:167–174
120. O’Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990) Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10:3569–3577

121. O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, Heaney RP, Kerzner LJ (2005) Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. *Am J Med* 118:778–781
122. Oestern HJ (2008) Traumatologie. In: Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B (eds) *Duale Reihe Chirurgie*. Thieme, Stuttgart. pp 731–905
123. Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T (1999) Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res* 14:1132–1144
124. Parfitt AM (1988) Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J* 36:143–144
125. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgöwer M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H, Müller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125:19–29
126. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14:74–79
127. Pettit M (2005) Treatment of gastroesophageal reflux disease. *Pharm World Sci* 27:432–435
128. van Pinxteren B, Sigterman KE, Bonis P, Lau J, Numans ME (2010) Short-term treatment with proton pump inhibitors, H₂-receptor antagonists and prokinetics for gastro-oesophageal reflux disease-like symptoms and endoscopy negative reflux disease. *Cochrane Database Syst Rev* 11:CD002095
129. Pue MA, Laroche J, Meineke I, de Mey C (1993) Pharmacokinetics of pantoprazole following single intravenous and oral administration to healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 44:575–578
130. Raschke M, Haas N, Stöckle U (2007) Unfallchirurgie. In: Siewert JR, Brauer RB (eds) *Basiswissen Chirurgie*. Springer Medizin Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 361–362

131. Ronga M, Fagetti A, Canton G, Paiusco E, Surace MF, Cherubino P (2013) Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. *Injury* 44 Suppl 1:S34–S39
132. Rossant J, Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1:592–594
133. Rössler H, Pitzen P, Rütther W, Steinhagen J (2007) *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Elsevier, Urban & Fischer, München
134. Roush JK, Wilson JW (1990) Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg* 19:208–214
135. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall J Jr, Ragab A, Benghuzzi H (2007) Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20:249–255
136. Rüter A, Trentz O, Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. Elsevier, Urban & Fischer, München
137. Sachs G (1997) Proton pump inhibitors and acid-related diseases. *Pharmacotherapy* 17:22–37
138. Sachs G, Prinz C, Loo D, Bamberg K, Besancon M, Shin JM (1994) Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J Biol Med* 67:81–95
139. Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B, Hersey S (1995) The pharmacology of the gastric acid pump: the H⁺,K⁺ ATPase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:277–305
140. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8:373–382
141. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF, Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on

- blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13:382–389
142. Schenk RK, Willenegger HR (1977) Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. *Unfallheilkunde* 80:155–160
 143. Schiebler TH (2004) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Springer, Berlin, Heidelberg
 144. Schmitt C, Lightdale CJ, Hwang C, Hamelin B (2006) A multicenter, randomized, double-blind, 8-week comparative trial of standard doses of esomeprazole (40 mg) and omeprazole (20 mg) for the treatment of erosive esophagitis. *Dig Dis Sci* 51:844–850
 145. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B, Gradl G (2008) Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26:184–189
 146. Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, Nöth U, Jatzke S, Jakob F (2005) Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1. *Protein Expr Purif* 42:219–225
 147. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A (2005) Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res* 23:489–493
 148. Sheraly AR, Lickorish D, Sarraf F, Davies JE (2009) Use of gastrointestinal proton pump inhibitors to regulate osteoclast-mediated resorption of calcium phosphate cements in vivo. *Curr Drug Deliv* 6:192–198
 149. Shi S, Klotz U (2008) Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 64:935–951

150. Shin JM, Sachs G (2008) Pharmacology of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep* 10:528–534
151. Shin JM, Besancon M, Prinz C, Simon A, Sachs G (1994) Continuing development of acid pump inhibitors: site of action of pantoprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 8 Suppl 1:11–23
152. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He TC (2006) CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26:2955–2964
153. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
154. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J, Gregg P (1994) Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res* 12:29–39
155. Steck R, Ueno M, Gregory L, Rijken N, Wullschleger ME, Itoman M, Schuetz MA (2011) Influence of internal fixator flexibility on murine fracture healing as characterized by mechanical testing and microCT imaging. *J Orthop Res* 29:1245–1250
156. Steen H, Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* 247:297–305
157. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G, Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop* 12:173–176
158. Tanaka M, Yamazaki H, Ryokawa Y, Hakusui H, Nakamichi N, Sekino H (1996) Pharmacokinetics and tolerance of pantoprazole, a proton pump inhibitor after

- single and multiple oral doses in healthy Japanese volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 34:415–419
159. Tanaka M, Ohkubo T, Otani K, Suzuki A, Kaneko S, Sugawara K, Ryokawa Y, Hakusui H, Yamamori S, Ishizaki T (1997) Metabolic disposition of pantoprazole, a proton pump inhibitor, in relation to S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype and genotype. *Clin Pharmacol Ther* 62:619–628
160. Targownik LE, Lix LM, Metge CJ, Prior HJ, Leung S, Leslie WD (2008) Use of proton pump inhibitors and risk of osteoporosis-related fractures. *CMAJ* 179:319–326
161. Targownik LE, Lix LM, Leung S, Leslie WD (2010) Proton-pump inhibitor use is not associated with osteoporosis or accelerated bone mineral density loss. *Gastroenterology* 138:896–904
162. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4:638–649
163. Terjesen T, Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 57:146–148
164. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Stevenson TR (1993) Midfacial fracture repair in the adult rat. *Ann Plast Surg* 31:66–71
165. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38:1424–1429
166. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP (2005) Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 20:152–158
167. Tuukkanen J, Väänänen HK (1986) Omeprazole, a specific inhibitor of H⁺-K⁺-ATPase, inhibits bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int* 38:123–125

168. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893–899
169. Utvåg SE, Grundnes O, Reikerås O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65:559–563
170. Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P (1990) Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111:1305–1311
171. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R, Global Consensus Group (2006) The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 101:1900–1920
172. Valuck RJ, Ruscin JM (2004) A case-control study on adverse effects: H2 blocker or proton pump inhibitor use and risk of vitamin B12 deficiency in older adults. *J Clin Epidemiol* 57:422–428
173. Visentin L, Dodds RA, Valente M, Misiano P, Bradbeer JN, Oneta S, Liang X, Gowen M, Farina C (2000) A selective inhibitor of the osteoclastic V-H(+)-ATPase prevents bone loss in both thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats. *J Clin Invest* 106:309–318
174. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113:312–317
175. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L (2009) Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 27:687–693
176. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20:149–155

177. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N, Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25:197–203
178. Yang YX, Lewis JD, Epstein S, Metz DC (2006) Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *JAMA* 296:2947–2953
179. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329–1337
180. Yu EW, Blackwell T, Ensrud KE, Hillier TA, Lane NE, Orwoll E, Bauer DC (2008) Acid-suppressive medications and risk of bone loss and fracture in older adults. *Calcif Tissue Int* 83:251–259
181. Zucman J (1960) Studies on the vascular connexions between periosteum, bone, and muscle. *Br J Surg* 48:324–328

7 Danksagung

Ich möchte mich hier bei allen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt und damit zum erfolgreichen Abschluss beigetragen haben:

Frau PD Dr. med. Tina Histing, meiner Doktormutter, danke ich für die Überlassung des Themas und ihre einzigartige Hilfe und großartige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Sie stand mir stets mit konstruktiver Kritik und Anregungen zur Seite.

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger möchte ich für seine Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit, seine Ratschläge und für das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften danken.

Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann danke ich für die konstruktiven Ratschläge und Anregungen während der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer und Frau Janine Becker danke ich ganz besonders für die einzigartige Unterstützung in der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die Unterstützung während den Tierversuchen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie für das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima sowie die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für Unterstützung während meines kompletten Studiums.

Meiner Ehefrau Tanja danke ich für das Motivieren in schwierigen Zeiten und die Geduld, die sie in dieser wohl oft anstrengenden Zeit für mich aufgebracht hat.

Zuletzt danke ich meiner Tochter Malou, die mich immer wieder durch ihr Lächeln aufgemuntert hat.

8 Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde auf untenstehenden internationalen Kongressen präsentiert und wie folgt publiziert:

8.1 Vorträge und Poster

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 25.-28. Oktober 2011, Berlin, Deutschland:

Histing T, **Stenger D**, Garcia P, Holstein JH, Pohlemann T, Menger MD. Pantoprazol beeinträchtigt die Frakturheilung im Mausmodell.

Annual Meeting of the Orthopaedic Society. 04.-07. Februar 2012, San Francisco, California, USA:

Histing T, **Stenger D**, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD. Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays bone remodeling during fracture healing in mice. (Poster)

8.2 Publikationen

Histing T, **Stenger D**, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 90:507–514

Abbildungsverzeichnis

1	Osteosynthesetechniken für das Mausfemur	23
2	Struktur des Pantoprazols	24
3	Wirkmechanismus der PPIs	25
4	MouseScrew™	31
5	Fixation des Beins während der OP	32
6	Mediopatellare Hautinzision mit Darstellung der Patellarsehne	32
7	Lateral luxierte Patella mit Sicht auf die Kondylen	33
8	Eröffnen des Markraums über die Fossa intercondylaris	33
9	Führungskanüle	33
10	Führungsdraht (Wolfram-Draht)	33
11	Geschlossene Frakturierung mittels 3-Punkt-Biegung	33
12	Implantation der MouseScrew™	33
13	Implantierte MouseScrew™	34
14	Refixierung der Patella	34
15	Hautnaht	34
16	Röntgenkontrolle Führungsdraht	34
17	Röntgenkontrolle nach Frakturierung	34
18	Postoperative Röntgenkontrolle	34
19	Röntgenbild 2 Wochen postoperativ	35
20	Explantierter Knochen nach zweiwöchiger Frakturheilung	36
21	Röntgenbild zur radiologischen Auswertung	37
22	Biomechanische Auswertung	38
23	Sagittaler, longitudinaler Schnitt durch das Femur	41

24	HPF zur Auswertung der TRAP-positiven Zellen	42
25	TRAP-positive Osteoklasten	42
26	Goldberg-Score	45
27	Absolute Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen	47
28	Relative Biegesteifigkeit der frakturierten Knochen	47
29	Absolute Biegesteifigkeit der unfrakturierten Knochen	48
30	Periostale Kallusfläche	49
31	Knochenanteil im periostalen Kallusgewebe	50
32	Knorpelanteil im periostalen Kallusgewebe	50
33	Bindegewebeanteil im periostalen Kallusgewebe	50
34	Histoscore nach 2 und 5 Wochen Frakturheilung	51
35	TRAP-positive Zellen pro HPF	52
36	Prozentuale Verteilung der TRAP-positiven Zellen	52
37	Western Blot Analyse von BMP-2	53
38	Western Blot Analyse von BMP-4	54
39	Western Blot Analyse von CYR 61	54
40	Western Blot Analyse von RANKL	54
41	Western Blot Analyse von OPG	55
42	Western Blot Analyse von PCNA	55

Tabellenverzeichnis

1	Studiendesign	30
2	Goldberg-Score	37
3	Histo-Score	39
4	Färbeverhalten bei der trichromen Masson-Goldner-Färbung	40
5	Übersicht über die analysierten Proteine und deren Funktion	43